



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS**

**CENTRO DE ESTUDIOS SOBRE LA  
UNIVERSIDAD**



**PERFILES DE FARMACORRESISTENCIA DE *Mycobacterium tuberculosis*  
EN CULTIVOS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR  
RECIÉN DIAGNOSTICADOS EN TAPACHULA, CHIAPAS.**

**Tesis que para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS PARA LA SALUD**

**Presenta**

**CARLOS EMILIO OROZCO MAGDALENO 11048001**

**Director de tesis**

**DR. ÁNGEL LUGO TRAMPE**

**Tapachula, Chiapas a 03 de mayo de 2024**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS  
CENTRO DE ESTUDIOS SOBRE LA UNIVERSIDAD



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
Mayo 08 de 2024  
Oficio No. CESU/CG/297/2024

**C. Carlos Emilio Orozco Magdaleno**  
Candidato al Grado de Doctor en Ciencias para la Salud  
P r e s e n t e.

Por medio del presente informo a Usted, que una vez recibidos los votos aprobatorios de los miembros del Comité Tutorial de la tesis intitulada:

PERFILES DE FARMACORRESISTENCIA DE Mycobacterium tuberculosis EN CULTIVOS DE PACIENTES  
CON TUBERCULOSIS PULMONAR RECIEN DIAGNOSTICADOS EN TAPACHULA, CHIAPAS

Se le AUTORIZA que lleve a cabo la impresión definitiva de cinco ejemplares de la tesis y dos ejemplares en formato disco compacto, los cuales deberá entregar:

- Un ejemplar de la tesis en formato disco compacto: anexar oficio de autorización de impresión de tesis Dirección de Desarrollo Bibliotecario de la Universidad Autónoma de Chiapas
- Cinco tesis impresas y un ejemplar en formato de disco compacto Área de Titulación del CESU para ser entregadas a los Sinodales.

Asimismo, se le informa que podrá consultar los requisitos de entrega de tesis en la página web de la Dirección de Desarrollo Bibliotecario en [www.biblioteca.unach.mx](http://www.biblioteca.unach.mx)

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente

"Por la conciencia de la necesidad de servir"

Mtro. Jordán Corzo Mancilla  
Coordinador General



C.c.p. Expediente/archivo  
MJCM/eaga.



Código: FO-113-05-05

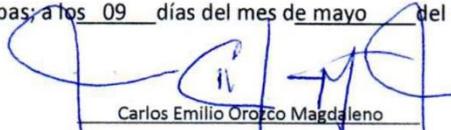
Revisión: 0

**CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE LA TESIS DE TÍTULO Y/O GRADO.**

El (la) suscrito (a) Carlos Emilio Orozco Magdaleno,  
Autor (a) de la tesis bajo el título de "PERFILES DE FARMACORRESISTENCIA DE Mycobacterium tuberculosis EN CULTIVOS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR RECIENTE DIAGNOSTICADOS EN TAPACHULA, CHIAPAS"  
presentada y aprobada en el año 2024 como requisito para obtener el título o grado de DOCTOR EN CIENCIAS PARA LA SALUD, autorizo licencia a la Dirección del Sistema de Bibliotecas Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH), para que realice la difusión de la creación intelectual mencionada, con fines académicos para su consulta, reproducción parcial y/o total, citando la fuente, que contribuya a la divulgación del conocimiento humanístico, científico, tecnológico y de innovación que se produce en la Universidad, mediante la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Consulta del trabajo de título o de grado a través de la Biblioteca Digital de Tesis (BIDITE) del Sistema de Bibliotecas de la Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH) que incluye tesis de pregrado de todos los programas educativos de la Universidad, así como de los posgrados no registrados ni reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT.
- En el caso de tratarse de tesis de maestría y/o doctorado de programas educativos que sí se encuentren registrados y reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), podrán consultarse en el Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma de Chiapas (RIUNACH).

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a los 09 días del mes de mayo del año 2024.

  
Carlos Emilio Orozco Magdaleno  
Nombre y firma del Tesisista o Tesisistas

## **AGRADECIMIENTOS**

**Este proyecto de Tesis fue posible por el apoyo incondicional brindado por el Dr. Ángel Lugo Trampe, Dra. Karina del Carmen Trujillo Murillo y Dra. Consuelo Chang Rueda**

**Al Programa Institucional para la Obtención del Grado Académico de la UNACH por darnos la oportunidad de culminar este peldaño académico.**

**A las personas involucradas en la consolidación de este trabajo y me refiero a los talleristas de tesis e inglés , muchas pero muchas gracias por sus comentarios y enseñanzas**

## **DEDICATORIA**

**Dedico estas palabras para todos aquellos que voluntaria e involuntariamente se cruzaron en mi camino y me mostraron lo bueno y lo malo de la vida, y fue mi responsabilidad tomar lo que me ha permitido seguir creciendo.**

**A mi Familia que el tiempo me ha dado, a quienes les debo gratitud por el tiempo compartido.**

**A mi Familia de Sangre les estoy eternamente agradecido por cada uno de los momentos felices y tristes que nos ha tocado vivir, por no olvidar la esencia que nos ha permitido levantarnos y seguir adelante.**

## ÍNDICE GENERAL

<b>Introducción</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 Antecedentes</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 Justificación</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3 Problema de Investigación</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4 Objetivos</b> .....	<b>18</b>
1.4.1 Objetivo General: .....	18
1.4.2 Objetivos Específicos: .....	18
<b>Marco Teórico</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Aspectos Generales de la Tuberculosis</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Farmacorresistencia De Mycobacterium Tuberculosis</b> .....	<b>20</b>
2.2.1 Aspectos Generales de la Farmacorresistencia.....	20
2.2.2 Desarrollo De Microorganismos Farmacorresistentes.....	21
<b>2.3 Farmacorresistencia de la Tuberculosis en México</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4 Situación de la Tuberculosis en Chiapas</b> .....	<b>24</b>
<b>2.5 Etiología</b> .....	<b>25</b>
2.5.1 Propiedades Generales de las Micobacterias .....	26
2.5.1.1 Mycobacterium Tuberculosis Complex.....	27
2.5.2 Aspectos Microbiológicos de Mycobacterium Tuberculosis. ....	28
2.5.2.1 Estructura.....	28
2.5.2.2 Características Morfológicas de la Observación Microscópica.....	30
2.5.3 Cultivo .....	31
<b>2.6 Genoma</b> .....	<b>32</b>
<b>2.7 Reservorio</b> .....	<b>32</b>
<b>2.8 Vías de Transmisión</b> .....	<b>32</b>
<b>2.9 Patogenia</b> .....	<b>32</b>
2.9.1 Entrada del Bacilo.....	32
2.9.2 Fagocitosis y Multiplicación Intracelular .....	34
2.9.3 La Etapa Ganglionar: Inducción de la Respuesta Inmune.....	36
2.9.4 Respuesta Inmune.....	36
2.9.5 Granuloma .....	37

2.9.6	Mecanismo de TB Latente.....	38
2.9.7	Tuberculosis Pulmonar Activa .....	40
2.9.8	Diseminación Extrapulmonar .....	41
<b>2.10</b>	<b>Aspectos Clínicos de Tuberculosis Pulmonar .....</b>	<b>43</b>
2.10.1	Sintomatología.....	44
2.10.1.1	Tuberculosis Pulmonar .....	44
2.10.1.2	Tuberculosis Extrapulmonar.....	44
2.10.1.3	Tuberculosis Diseminada. ....	44
<b>2.11</b>	<b>Diagnóstico .....</b>	<b>44</b>
2.11.1	Detección de Tuberculosis Activa.....	45
2.11.1.1	Baciloscopia.....	46
2.11.1.2	Cultivo. ....	48
2.11.1.3	Pruebas de Biología Molecular.....	50
2.11.1.4	Ensayo de Susceptibilidad a los Medicamentos de Observación Microscópica (MODS).....	51
2.11.1.5	Radiografías de Tórax.....	52
2.11.1.6	Estudio Histopatológico. ....	52
2.11.2	Pruebas Inmunológicas para Diagnóstico de ITBL. ....	53
2.11.2.1	Prueba Cutánea de la Tuberculina. ....	53
2.11.2.2	Prueba IGRA. ....	53
<b>2.12</b>	<b>Tratamiento .....</b>	<b>54</b>
2.12.1	Quimioprofilaxis (Terapia Preventiva).....	60
<b>2.13</b>	<b>Isoniazida .....</b>	<b>61</b>
2.13.1	Informe General.....	62
2.13.2	Breve Historia.....	62
2.13.3	Mecanismo de Acción .....	62
2.13.4	Efectos Adversos .....	63
<b>2.14</b>	<b>Farmacorresistencia.....</b>	<b>65</b>
2.14.1	Resistencia a INH .....	68
<b>Metodología.....</b>		<b>73</b>
<b>3.1</b>	<b>Estrategia General.....</b>	<b>73</b>

<b>3.2</b>	<b>Universo de Estudio .....</b>	<b>74</b>
<b>3.3</b>	<b>Población de Estudio.....</b>	<b>74</b>
<b>3.4</b>	<b>Tipo de Estudio.....</b>	<b>75</b>
<b>3.5</b>	<b>Criterios de Selección.....</b>	<b>75</b>
	3.5.1 Criterios de Inclusión.....	75
	3.5.2 Criterios de Exclusión .....	75
	3.5.3 Criterios de Eliminación.....	75
<b>3.6</b>	<b>Procesamiento de Muestras Clínicas .....</b>	<b>75</b>
	3.6.1 Cultivos en Medio Löwenstein-Jensen.....	76
	3.6.2 Método de Petroff Modificado: Procedimiento para la descontaminación del esputo usando hidróxido de sodio y N-acetil-L-cisteína .....	76
	3.6.2.1 Preparación de Inóculo e Inoculación en Medio LJ .....	77
	3.6.2.2 Extracción de ADN de Aislados Microbiológicos de <i>M. tuberculosis</i> ...	78
	3.6.2.3 Cuantificación de ADN .....	79
	3.6.3 Diagnóstico Molecular Confirmatorio de <i>M. tuberculosis</i> .....	79
	3.6.3.1 Principio de la Prueba.....	80
	3.6.3.2 Preparación del Inóculo .....	81
	3.6.3.3 Inóculo de un Medio Líquido .....	82
	3.6.3.4 Dilución del Inóculo .....	82
	3.6.3.5 Preparación de la Placa REMA .....	84
	3.6.3.6 Inoculación de las Placas .....	86
	3.6.3.7 Preparación de la Solución de Resazurina.....	86
	3.6.3.8 Desarrollo del Color e Interpretación de los Resultados .....	86
	3.6.3.9 Amplificación de la región HotSpot del gen <i>rpoB</i> .....	87
	3.6.3.10 Amplificación de las regiones HotSpot de los genes <i>katG</i> , <i>inhA</i> y <i>rrs</i> . 88	
	3.6.3.11 Amplificación de los Amplicones .....	89
	3.6.3.12 Purificación de los amplicones obtenidos mediante el kit PureLink PCR Purification .....	91
	3.6.3.13 Electroforesis de Amplicones.....	92
	3.6.3.14 Marcaje y Secuenciación .....	92
	<b>Resultados.....</b>	<b>95</b>

<b>4.1</b>	<b>Cultivos en Medio Löwenstein-Jensen .....</b>	<b>95</b>
<b>4.2</b>	<b>Confirmación Molecular de Pertenencia al Complejo Tuberculosis Mediante qPCR</b>	<b>96</b>
4.2.1	Prueba de susceptibilidad fenotípica in vitro a RMP, INH, EST, KAN, AMI y CAP de los aislados clínicos por medio del ensayo de microtitulación de resazurina (REMA) .....	96
	<i>Discusiones</i> .....	<i>123</i>
	<i>Conclusiones</i> .....	<i>126</i>
	<i>Referencias</i> .....	<i>127</i>

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Mecanismos de resistencia a los fármacos en Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
<i>Tabla 2 Lectura de extendidos coloreados por Ziehl-Neelsen</i> .....	47
<i>Tabla 3 Informe de los resultados de la baciloscopia</i> .....	47
<i>Tabla 4 Esquema de diferenciación de M. tuberculosis de las micobacterias ambientales</i> .....	49
<i>Tabla 5 Clasificación racional y uso secuencial de los fármacos antituberculosos</i> .....	56
<i>Tabla 6 Clasificación de tratamientos por grupo</i> .....	57
<i>Tabla 7 Preparación de solución de Hidróxido de Sodio-N-Acetil-L-Cisteína</i> .....	76
<i>Tabla 8 Fármacos para la detección de MDR</i> .....	80
<i>Tabla 9 Preparación de antibióticos</i> .....	82
<i>Tabla 10 Preparación de antibióticos</i> .....	85
<i>Tabla 11 Concentración de interrupción</i> .....	87
<i>Tabla 12 Condiciones para la amplificación del gen diana</i> .....	87
<i>Tabla 13 Condiciones de reacción:</i> .....	87
<i>Tabla 14 Condiciones del termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystems):</i> ....	88
<i>Tabla 15 Amplificación de las regiones HotSpot de los genes KatG, inhA y rrs</i> .....	88
<i>Tabla 16 Condiciones de reacción:</i> .....	89
<i>Tabla 17 Condiciones del termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystems)</i> .....	89
<i>Tabla 18 Dilución 1:20 Amplificación de los amplicones</i> .....	90
<i>Tabla 19 Condiciones de reacción para ambas regiones en katG te inhA:</i> .....	91
<i>Tabla 20 Condiciones del termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystems)</i> .....	91
<i>Tabla 21 Condiciones de reacción</i> .....	93
<i>Tabla 22 Condiciones de reacción</i> .....	93
<i>Tabla 23 El programa para el marcaje se describe a continuación:</i> .....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i>	Tasa de incidencia y mortalidad (100 000 habitantes) periodo 1990-2019 en México	23
<i>Figura 2</i>	Casos de TB Farmacorresistente en México, 2000 a 2019.....	24
<i>Figura 3</i>	Casos nuevos de tuberculosis (todas las formas) en Chiapas del año 2000-2016 .....	25
<i>Figura 4</i>	Representación esquemática de la pared celular de MTB.....	30
<i>Figura 5</i>	Micobacterias en frotis de esputo teñido. Técnica de Ziehl- Neelsen.....	31
<i>Figura 6</i>	Escenarios clínicos de MTB.....	34
<i>Figura 7</i>	Formación del granuloma.....	37
<i>Figura 8</i>	Granulomas tuberculosos.....	39
<i>Figura 9</i>	Ciclo infeccioso de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	41
<i>Figura 10</i>	Cultivo en Löwenstein-Jensen.....	50
<i>Figura 11</i>	Pirámide de éxito de tratamiento .....	59
<i>Figura 12</i>	Estructura molecular de inoniazida en 2D(A) y 3D(B). .....	61
<i>Figura 13</i>	Mecanismo de acción de INH. ....	64
<i>Figura 14</i>	Mutaciones en el gen <i>katG</i> .....	72
<i>Figura 15</i>	Estrategia general.....	73
<i>Figura 16</i>	Preparación de antibióticos .....	84
<i>Figura 17</i>	Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en medio Löwenstein-Jensen.....	95
<i>Figura 18</i>	Diagnóstico molecular por qPCR de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	96
<i>Figura 19</i>	Prueba de susceptibilidad a RMP de los aislados de <i>M. tuberculosis</i> .....	97
<i>Figura 20</i>	Resultados de las pruebas de susceptibilidad por medio del ensayo REMA a INH de los aislados de MTB .....	98
<i>Figura 21</i>	Prueba de susceptibilidad a Estreptomina de los aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> .....	99
<i>Figura 22</i>	Prueba de susceptibilidad a Kanamicina/Amikacina. ....	100
<i>Figura 23</i>	Prueba de susceptibilidad a Capreomicina. ....	101
<i>Figura 24</i>	Amplicones del gen <i>rpoB</i> .....	101
<i>Figura 25</i>	Amplicones del gen <i>katG</i> .....	102
<i>Figura 26</i>	Amplicones del gen <i>inhA</i> .....	102
<i>Figura 27</i>	Amplicones del gen <i>rrs</i> parte 1.....	103

<b>Figura 28</b> Amplicones del gen <i>rrs</i> parte 2.....	103
<b>Figura 29</b> Análisis de la secuencia de la cepa de referencia H37Rv en la región <i>rpoB526</i> .....	116
<b>Figura 30</b> Análisis de la región <i>rpoB526</i> mutada.....	117
<b>Figura 31</b> Análisis de la secuencia de la cepa H37Rv en la región <i>katG315</i> .....	117
<b>Figura 32</b> Análisis de la región <i>katG315</i> mutada.....	118
<b>Figura 33</b> Eletroferograma de la cepa de referencia H37Rv en la posición 1239 del gen <i>rrs</i> ..	118
<b>Figura 34</b> Electroferograma de la muestra 3 en la posición 1239 del gen <i>rrs</i> .....	119
<b>Figura 35</b> Electroferograma de la cepa de referencia H37Rv en la posición 492 del gen <i>rrs</i> ..	119
<b>Figura 36</b> Electroferograma de la muestra 6 en la posición 492 del gen <i>rrs</i> .....	120
<b>Figura 37</b> Electroferograma de la cepa de referencia H37Rv en la posición 1505 del gen <i>rrs</i>	120
<b>Figura 38</b> Electroferograma de la muestra 9 en la posición 1505 del gen <i>rrs</i> .....	121

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>Ag 85</b>	Antígeno 85
<b>ATB</b>	Tuberculosis Activa
<b>BAAR</b>	Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes
<b>BCG</b>	Vacuna Calmette y Guérin
<b>C</b>	Citosina
<b>CENAPRECE</b>	Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>COVID-19</b>	Coronavirus
<b>Dr.</b>	Doctor
<b>EE.UU.</b>	Estados Unidos
<b>EMB</b>	Etambutol
<b>EMBL</b>	European Molecular Biology Laboratory
<b>ESAT-6</b>	Early Secretory Antigenic Target 6 kd
<b>FAS II</b>	Ácido Graso Sintetasa
<b>FASTA</b>	Format for Nucleotide Sequences
<b>FEV 1</b>	Volumen Espiratorio Forzado en un Segundo
<b>FR</b>	Fármaco Resistencia
<b>G</b>	Guanina
<b>G+C</b>	Guanina + citosina
<b>HRAE</b>	Hospital Regional de Alta Especialidad
<b>IGRA</b>	Inteferon-Gamma Release Assay
<b>INH</b>	Resistencia a la Ionizada
<b>ITBL</b>	Infección por Tuberculosis Latente
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<b>KatG</b>	Gen Catalasa-Peroxidasa
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>MA</b>	Macrófago Alveolar
<b>MDR</b>	Multirresistencia
<b>MODS</b>	Medicamento de Observación Microscópica
<b>MTB</b>	Mycobacterium tuberculosis
<b>MTBC</b>	Mycobacterium tuberculosis complex
<b>NAD</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Forma Oxidada
<b>NADH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Forma Reducida
<b>NALC</b>	N-Acetil-L-Cisteína
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>OADC</b>	Ácido Oleico Dextrosa Catalasa
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS</b>	Organización panamericana de la salud
<b>PAS</b>	Acido Para-Amino Salicílico
<b>pb</b>	Pares de Bases

<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PDD</b>	Derivado Proteínico Purificado
<b>PGRSs</b>	Polymorphic G+C-Rich Secuences
<b>pH</b>	Potencial de Hidrogeno
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>PZA</b>	Pirazinamida
<b>QIAGEN</b>	Master Mix Quantitec Probe PCR Kit
<b>REMA</b>	Microtitulación de Resazurina
<b>RIF</b>	Rifampicina
<b>RMP</b>	Rifampicina
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RPF</b>	Factores Promotores de la Reanimación
<b>RR-TB</b>	Tuberculosis Resistente a la Rifampicina
<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>SM</b>	Estreptomina
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SR</b>	Sintomáticos Respiratorios
<b>SSA</b>	Secretaria de Salud
<b>T</b>	Timina
<b>TAES</b>	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
<b>TB TF</b>	Tuberculosis Todas las Formas
<b>TB</b>	Tuberculosis
<b>TB-MDR</b>	Tuberculosis Multidrogorresistente
<b>TB-XDR</b>	Tuberculosis Extremadamente Resistente
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>TP-TDR</b>	Tuberculosis Totalmente Resistente
<b>UICter</b>	Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humano

## Resumen

La farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis* constituye una amenaza significativa a nivel mundial, subrayando la importancia de identificar perfiles de resistencia a agentes farmacológicos de primera y segunda línea en cohortes de pacientes diagnosticados recientemente con tuberculosis pulmonar (TB) y aún no tratados. Este estudio examinó 14 muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico inicial de TB sin tratamiento previo. Cinco de estas muestras fueron excluidas del análisis debido a contaminación fúngica. Las 9 muestras restantes manifestaron crecimiento bacteriano tras 19 días de incubación en el medio *Löwenstein-Jensen*, seguido de una confirmación molecular mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Dentro de este conjunto, únicamente la muestra M3 demostró resistencia *in vitro* a la Rifampicina utilizando la técnica colorimétrica de microdilución con resazurina (REMA). Se observó resistencia a la Isoniacida y la Estreptomicina en 7 muestras. A su vez, todas las muestras exhibieron sensibilidad moderada hacia la Kanamicina, mientras que tres evidenciaron resistencia a la Capreomicina. De forma específica, solo la muestra M3 presentó mutaciones en los genes *rpoB*, *KatG* y *rrs*, sugiriendo esto la razón de su farmacorresistencia. Las muestras 6 y 9 revelaron mutaciones únicamente en el gen *rrs*.

El análisis genotípico detallado de la muestra M3 identificó tres mutaciones significativas: H526Y, vinculada a la resistencia a Rifampicina; S315T, implicada en la resistencia fenotípica a Isoniacida; y T1239C. En la muestra 6 se detectó la mutación C492T, y en la muestra 9, la T1505G. Estas alteraciones genéticas sugieren una complejidad en los mecanismos de resistencia, lo que apunta hacia la necesidad de adoptar estrategias de investigación más exhaustivas para entender la resistencia antimicrobiana en *M. tuberculosis*.

Los hallazgos de este estudio ponen de manifiesto la presencia de resistencia a la Rifampicina en un solo aislado, lo que resalta la heterogeneidad en la susceptibilidad a este importante antibiótico. Además, estos resultados sugieren la potencial influencia de la metodología de inoculación en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Estas observaciones son cruciales ya que la resistencia a Rifampicina se considera un marcador predictivo de TB multirresistente (MDR-TB), y su detección, aunque sea en un bajo porcentaje de aislados, señala un riesgo inminente de diseminación de cepas farmacorresistentes.

## Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa grave causadas por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que ha sido un desafío para la salud pública durante décadas. Se transmite a través del aire cuando las personas infectadas expulsan bacterias al hablar, toser o estornudar. La TB afecta principalmente los pulmones, pero también se puede presentar en otros sitios y tejidos del cuerpo, como el sistema nervios, los genitales, los huesos, la piel y los ganglios linfáticos

### 1.1 Antecedentes

El informe global de la tuberculosis (2023) estima que 10.6 millones de personas enfermaron de tuberculosis en el año 2022. Esto representa un aumento con respecto al año 2021 con 10.3 millones y 10 millones del 2020. Se señala que estos aumentos en los casos de TB son las consecuencias de las interrupciones en el diagnóstico y tratamiento debido a la pandemia de COVID-19. Las medidas de control de la COVID-19, como el distanciamiento social, el confinamiento y la redistribución de recursos sanitarios, han afectado negativamente la capacidad de abordar otras enfermedades infecciosas, incluida la tuberculosis.

En México en el año 2021 se notificaron 22 275 de casos de TB; de estos 19 769 son casos nuevos y 486 son casos nuevos resistentes. La mayor tasa de incidencia la tiene el Estado de Baja California (58.5) y la menor tasa la tiene el Estado de Tlaxcala (1.9), por lo consiguiente la tasa de mortalidad alta y baja se encuentra en los mismos estados. Por grupo etario la mayor concentración se encuentra de 20 a 64 años (77%), en cuanto al sexo los hombres representan el 63% de los casos nuevos y las mujeres el 37%. De las enfermedades asociadas con TB encontramos la diabetes, la desnutrición, las neoplasias, el alcoholismo, la inmunosupresión, las drogas, el VIH, el tabaquismo y la COVID-19 con el 67% de los casos. En el caso de los grupos de riesgo para la enfermedad de la TB, se ha documentado durante años los grupos más vulnerables; indígenas, presos, extrema pobreza, indigentes, migrantes y embarazadas.

En el año 2016, Chiapas ocupó la cuarta posición entre los estados con mayor número de casos nuevos de TB en México. Al año en Chiapas se presentan más de mil 200 casos nuevos de Tuberculosis y las zonas endémicas son Tapachula, y Tuxtla Gutiérrez, donde se concentra

alrededor del 40% y 20% de los casos. Representa una alta carga y resalta la necesidad de implementar medidas de tratamiento y prevención.

El perfil epidemiológico de la tuberculosis pulmonar (TB) presenta desafíos significativos debido a la farmacorresistencia que es el resultado de diversos factores. Entre estos factores se incluyen: la falta de seguimiento de los programas, falta de apego del paciente, aplicación de medicamentos equivocados y el abasto insuficiente de los medicamentos. Estos aspectos han favorecido el resurgimiento de cepas resistentes a los tratamientos convencionales.

Esta farmacorresistencia se ha asociado con lo siguiente: a la presencia de mutaciones en el ADN, a la expresión diferencial de los genes, y a otros mecanismos involucrados, como la resistencia intrínseca de la pared celular de las micobacterias.

## 1.2 **Justificación**

El propósito de este estudio es determinar la farmacorresistencia del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes recién diagnosticados con tuberculosis proponiendo analizar los perfiles de resistencia *in vitro* a fármacos de primera y segunda línea de aislados de la cepa obtenida de pacientes que no han recibido tratamiento a la enfermedad para detectar las mutaciones claves en los genes *rpoB*, *inhA*, *katG* y *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis*, genes que se sabe que se saben están asociados a la farmacorresistencia.

## 1.3 **Problema de Investigación**

El planteamiento se origina de la falta de información en los casos de tuberculosis de recién diagnóstico no se considera la posibilidad de existencia de farmacorresistencia. Por lo que la pregunta de investigación que se propuso ¿Existe farmacorresistencia a los fármacos de primera y segunda línea para el tratamiento de la tuberculosis en los pacientes recién diagnosticados?

## 1.4 Objetivos

Los objetivos generales y específicos para el tema de investigación son los siguientes:

### 1.4.1 *Objetivo General:*

Determinar los perfiles de farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en cultivos de pacientes con tuberculosis pulmonar de reciente diagnóstico

### 1.4.2 *Objetivos Específicos:*

Determinar la farmacorresistencia *in vitro* a fármacos de primera y segunda línea de aislados de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar de diagnóstico

En conjunto, el estudio tiene como objetivo proporcionar una comprensión más profunda de la resistencia a los medicamentos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis en pacientes recién enfermedad.

## 2. Marco Teórico

Cada año aproximadamente 250,000 personas mueren a causa de la Tuberculosis farmacorresistente[siendo] un tema de salud importante si la infección se transforma en una enfermedad intratable y letal en entornos de bajos recursos (globally, 2016)

### 2.1 Aspectos Generales de la Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es la enfermedad infecciosa que ha causado el mayor número de muertes en la historia de la humanidad; tan solo en los dos siglos precedentes se ha cobrado más de mil millones de vidas (Tuberculosis, 2018, Paulson, 2013, cómo se citó en OMS,2020)

En la actualidad la TB es una de las enfermedades reemergentes de mayor mortalidad, impulsada por las deficiencias inmunes de personas infectadas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), y por el aumento de la resistencia a los medicamentos antifímicos. En el contexto de la pandemia SARS-CoV-2 (coronavirus de tipo2 causante del síndrome respiratorio agudo severo), la TB paso a ser la segunda enfermedad infecciosa más mortífera (1.3 millones) por detrás del COVID-19 y sobrepasando al VIH/SIDA (0.68 millones (Tuberculosis, 2023) esto acelero la necesidad de diagnosticarlo lo más pronto y eficientemente. Lo más preocupante es la multirresistencia (MDR), definida como la resistencia a la isoniazida (INH), y la rifampicina (RIF) los medicamentos antituberculosos más eficaces.

La organización mundial de la salud (OMS), en su último informe global de la tuberculosis (2023) reporto que 7 millones de personas fueron diagnosticadas con tuberculosis. Se trata de la mayor cifra registrada desde que la OMS en 1995 le da seguimiento a esta enfermedad. Se estima que en 2022 fue causante de la muerte de 1.3 millones, y contrajeron la enfermedad 10.6 millones de personas; de estas el 55% fueron hombres, el 33% mujeres y el 12% niños (de 0 a 14 años), la

tasa de incidencia estimada fue de 133 (nuevos casos por cada 100,000 habitantes), 30 países concentraron el 87% de los casos de todo el mundo y dos tercios de los casos totales se registraron en 8 países; la India (27%), Indonesia (10%), China (7.1%), Filipinas (7%), Pakistán (5.7%), Nigeria (4.5%), Bangladesh (3.6%) y la República Democrática del Congo (3%). Se estima que 410, 000 personas contrajeron la tuberculosis multirresistente o resistente a la rifampicina (TB-MDR/RR).

## **2.2 Farmacorresistencia De Mycobacterium Tuberculosis**

Se estima que la tuberculosis, el paludismo y la *Escherichia coli* encabezará las causas que determinan el elevado tributo económico que impone la resistencia a lo antimicrobianos con una pérdida mundial de 100 billones de dólares en 2050 (globally, 2016)

### **2.2.1 Aspectos Generales de la Farmacorresistencia**

La enfermedad de la TB ha cambiado en su línea del tiempo desde la administración del primer antibiótico en 1944. Lo que anteriormente se había considerado como una enfermedad que debía tratarse en un hospital, se transformó en una enfermedad que podía tratarse con antibióticos; no mucho después de que el primer antibiótico fuera administrado, emergió la farmacorresistencia (FR) principalmente por el uso de estreptomicina (Wolinsky E, 1948, citado en: Flores Treviño, 2013). La OMS en su reporte de la estrategia mundial de investigación e innovación contra la tuberculosis confirman que los programas nacionales contra la enfermedad presentan problemas nuevos y antiguos: la incapacidad de detectar a las personas afectadas, la pandemia de infección por enfermedades concomitantes y la propagación de la FR (OMS, 2020)

### **2.2.2 Desarrollo De Microorganismos Farmacorresistentes**

La FR se define como la capacidad temporal o permanente de los microorganismos y su progenie de permanecer viables y multiplicarse en presencia de una concentración de antibiótico que normalmente destruiría o inhibiría su crecimiento celular. Se considera que una cepa es resistente cuando el 0.1% del inóculo bacteriano es resistente a la acción del fármaco, Musser (1995), concluyó la comprensión de las bases moleculares de la resistencia a los antimicrobianos en TB; la FR suele deberse a simples sustituciones de nucleótidos en lugar de la adquisición de nuevos elementos genéticos que codifican enzimas que alteran los antibióticos. La MDR surge como consecuencia de la acumulación gradual de mutaciones conferidas. Aunque se ha avanzado la variable de las localizaciones intragénicas de las mutaciones ha presentado desafíos a la detección de MDR por métodos moleculares. Además, la resistencia a ciertos fármacos puede implicar mutaciones en uno de varios genes o complejos genéticos posibles. Estos problemas pueden ser importantes en cualquier esfuerzo por desarrollar y Validar métodos rápidos y precisos para la detección de resistencias a múltiples fármacos. (Parsons, 2005)

La tabla 1 nos presenta los 12 genes involucrados en la resistencia a fármacos en *M. tuberculosis*

**Tabla 1***Mecanismos de resistencia a los fármacos en Mycobacterium tuberculosis*

Mecanismo de acción	Fármaco	Gen asociado a resistencia	Frecuencia de mutaciones, %
Inhibición de la síntesis de la pared celular	Isoniazida	KatG	40-60
		inhA	20-34
		ahpC	10-15
		kasA	14
		Ndh	10
		Etionamida	inhA
	Etambutol	embCAB	50-65
Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos	Rifampicina	rpoB	>95
	Fluoroquinolonas	gyrA, gyrB	75-95
	Estreptomicina	rpsL	52-59
		Rrs	8-21
Inhibición de síntesis proteica	Amikacina/ Kanamicina	Rrs	80
Inhibición de la síntesis de ácidos míclicos	Pirazinamida	pncA	70-97

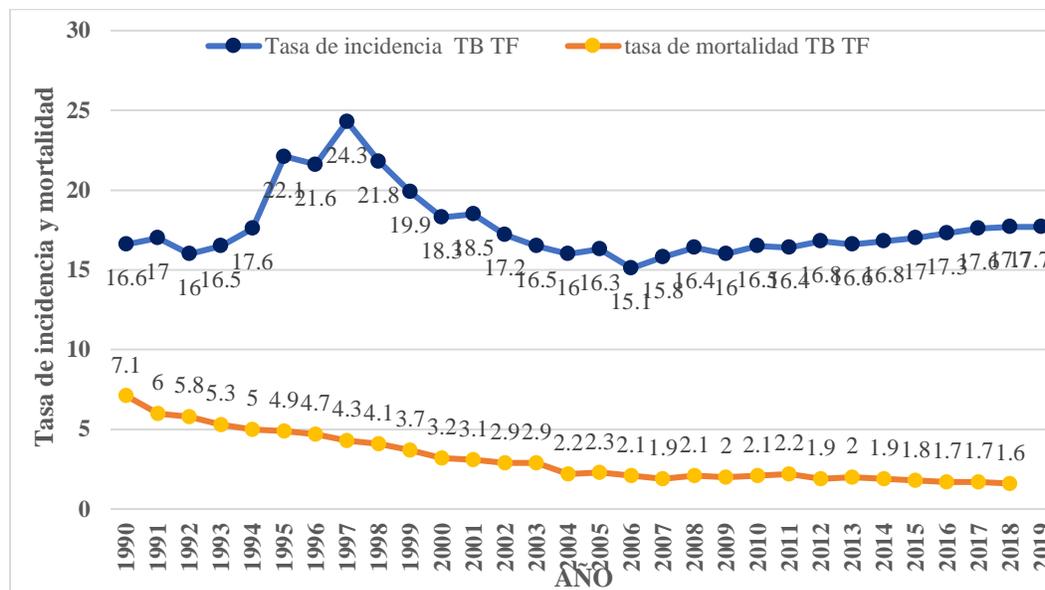
Nota: adaptado de grupo de fármacos usados para el tratamiento de tuberculosos (Treviño, 2013)

### 2.3 Farmacorresistencia de la Tuberculosis en México

En México a través de la OMS y la Unión Internacional contra la TB inicio un programa de vigilancia en 1994 para obtener información sobre la prevalencia de la resistencia a los medicamentos en tres estados de la República Mexicana; Baja California, Oaxaca y Sinaloa. Siendo el primer estudio de FR que se reportó en población mexicana con alta y baja incidencia (OMS, 1997 citado en Ramaswamy et al., 2004). En los últimos 20 años se tiene reportes de la tasa de incidencia y mortalidad por tuberculosis de todas las formas (TB TF), perdiéndose los datos del 2020 debido a la pandemia ocasionada por el COVID-19.

**Figura 1**

*Tasa de incidencia y mortalidad (100 000 habitantes) periodo 1990-2019 en México*



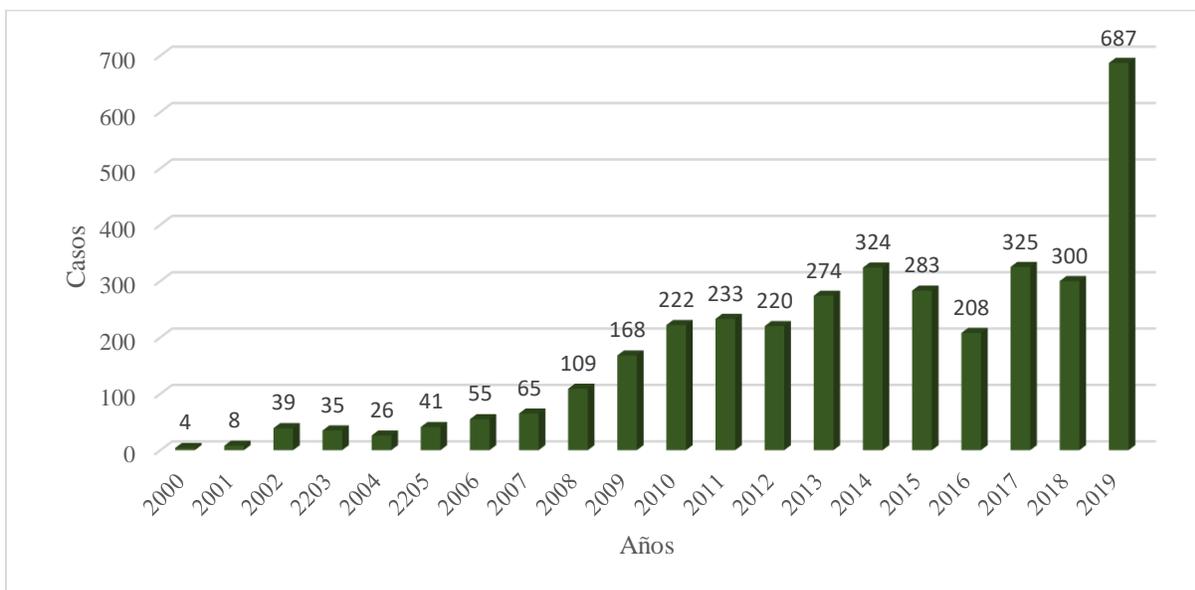
Nota. Fuente: CENAPRECE. (2021).

En México la enfermedad de la TB, en el año 2021 se notificaron 22 275; de estos 19 769 son casos nuevos y 486 son casos nuevos resistentes, la mayor tasa de incidencia la tiene el Estado de Baja California (58.5) y la menor tasa la tiene el Estado de Tlaxcala (1.9), por lo consiguiente la tasa de mortalidad alta y baja se encuentra en los mismos estados. Por grupo etario la mayor concentración (77%), se encuentra de 20 a 64 años, en cuanto al sexo los hombres representan el 63% de los casos nuevos y las mujeres el 37%, de las enfermedades asociadas representan un 67% entre las que encontramos; diabetes, desnutrición, neoplasias, alcoholismo, inmunosupresión, drogas, VIH, tabaquismo y COVID-19. En el caso de los grupos de riesgo para la enfermedad de la TB, se ha documentado durante años los grupos más vulnerables; indígenas, presos, extrema pobreza, indigentes, migrantes y embarazadas (SSA, 2021).

Para el año 2019 (Figura 2) se registraron 687 casos con algún tipo de resistencia el 79%, ingresaron a tratamiento las personas afectadas por Tuberculosis con resistencia a fármacos cortando con ello cadenas de transmisión. La localización fue principalmente pulmonar (93%). Los estados que presentaron mayor número de casos fueron: Nuevo León (20.7%), Veracruz (12.4%), Sonora (7.1%), Chiapas (6.8%) y Baja California (6.8%).

## Figura 2

*Casos de TB Farmacorresistente en México, 2000 a 2019*



Nota. Fuente: CENAPRECE. (2021).

### 2.4 Situación de la Tuberculosis en Chiapas

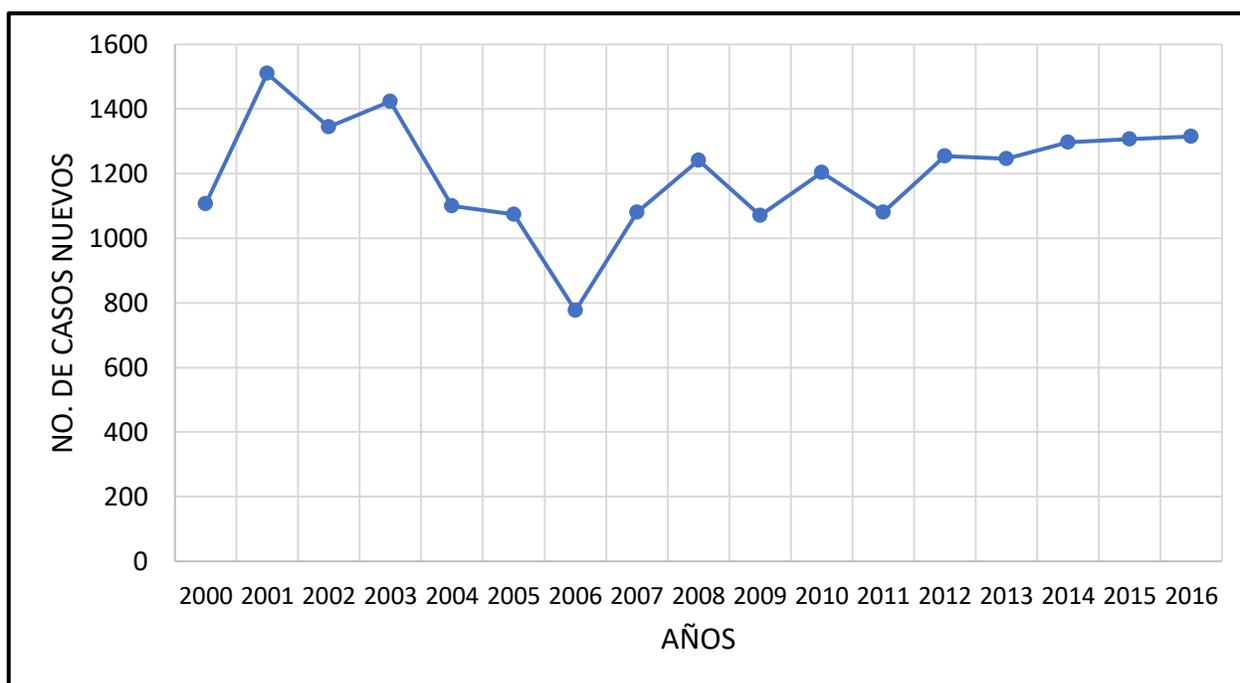
En el año 2016, Chiapas ocupó la cuarta posición entre los estados con mayor número de casos nuevos de TB en México. Al año, en Chiapas se presentan más de mil 200 casos nuevos (**Fig. 3**) de Tuberculosis y las zonas endémicas son Tapachula, donde se concentra alrededor del 40 por ciento de los casos, y Tuxtla Gutiérrez, con aproximadamente 20 por ciento de ellos (Secretaría de Salud, 2023)

La “Perla del Soconusco” cuenta con el 40 % de los casos de toda la entidad, lo que la coloca entre las primeras 10 ciudades de todo el país con mayor número de tuberculosis; el fenómeno migratorio es el principal factor por el que Tapachula cuenta con estas cifras.

En lo que se refiere a la situación en la que se encuentra el estado de Chiapas a nivel nacional, la pobreza extrema, la desnutrición y lo inaccesible que son los servicios de salud provocan que 117 municipios de la entidad tengan casos de Tuberculosis (Chiapas, 2018).

### Figura 3

*Casos nuevos de tuberculosis (todas las formas) en Chiapas del año 2000-2016*



Nota. Fuente: CENAPRECE. (2021)

## 2.5 Etiología

La TB es causado por miembros de la especie *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) Se consideran agentes etiológicos de la TB humana: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*. La mayoría de los casos de tuberculosis se atribuyen a *M. tuberculosis*

(patógeno estricto) o al organismo estrechamente relacionado *Mycobacterium africanum*, *M. canetti*, una minoría de los casos se debe a miembros zoonóticos del complejo, como *Mycobacterium bovis* o *M. caprae* (Sanou et al., 2015)

### **2.5.1 Propiedades Generales de las Micobacterias**

El género *Mycobacterium*, pertenece al grupo de bacterias del orden *Actinomycetales* de la familia *Mycobacteriaceae*. Está formado por bacilos aerobios facultativos, microorganismos pequeños en forma de bastón que no poseen flagelos, no forman esporas, no producen toxinas y no poseen cápsula, ácido-alcohol-resistentes (es decir, resisten a la decoloración con soluciones ácidas débiles a fuertes) gracias a la presencia de cadenas de ácidos micólicos intermedias o largas en su pared celular. Se diferencian de otras bacterias en varios aspectos, muchos de ellos en cuestiones relacionadas con las propiedades de la pared celular. Diferentes características, como la cantidad y variedad de lípidos complejos presentes en la envoltura (Trabulsi, 2015)

La correcta localización de lípidos en la pared celular de las micobacterias, principalmente en la capa más externa, es necesaria para su papel en la patogenicidad, lo que hace que el transporte de lípidos sea un proceso esencial en las micobacterias. Las proteínas que transportan lípidos son por lo tanto importantes factores de virulencia y dianas atractivas para los medicamentos (Bailo et al., 2015) La velocidad de crecimiento entre especies es bastante variada, diferenciada y entre grupos de crecimiento lento, moderado y rápido (Trabulsi, 2015)

Las bacterias se clasifican en el género *Mycobacterium* en función de: 1) su capacidad de ácido-alcohol resistencia, 2) la presencia de ácidos micólicos con 70 a 90 átomos de carbono y 3) un elevado contenido (61 – 71%) de guanina + citosina (G + C) en su ácido desoxirribonucleico (ADN). Las micobacterias poseen una pared celular compleja y rica en lípidos responsable de

muchas de las propiedades características de las bacterias (p. ej., su ácido-alcohol resistencia, crecimiento lento, resistencia a detergentes, resistencia a los antibióticos antibacterianos frecuentes y la respuesta inmunitaria del hospedador; antigenicidad). Las proteínas asociadas a la pared celular constituyen antígenos importantes a nivel biológico ya que estimulan la respuesta inmunitaria celular del paciente (Murray, 2017)

La tuberculosis es la enfermedad más importante desde el punto de vista de salud pública entre las causadas por las micobacterias. *Mycobacterium tuberculosis* es el causante de la mayoría de los casos de tuberculosis en el mundo entero (OPS, 2008)

#### **2.5.1.1 Mycobacterium Tuberculosis Complex.**

Engloba a un grupo de micobacterias que presentan >95% de homología en su DNA, secuencias de RNAr 16S totalmente idénticas y que se designan como “complejo *M. tuberculosis*” (o MTBC), incluye: *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. bovis BCG* (una cepa variante de laboratorio utilizada en vacunación y en instalaciones vesicales en pacientes con neoplasia de vejiga), *M. microti*, *M. orygis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae* y el recientemente reconocido *M. mungi* (Sanou et al., 2015) Esta extrema similitud prueba que todos ellos tienen un antepasado común. Sin embargo, difieren en términos de tropismo del hospedador, fenotipos y patogenicidad: *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), es el agente etiológico de la TB en humanos en todo el mundo; *M. africanum* que causa TB en humanos solo en ciertas regiones de África, aunque, obviamente su dispersión en otras áreas geográficas es posible de la mano de las corrientes migratorias; *M. canetti* que también causa TB en humanos y parece estar limitada al Cuerno de África; *M. pinnipedi*, infecta focas y leones marinos; *M. caprae*, ovejas y cabras; *M. microti*, que causa TB en roedores y en un número muy limitado de mamíferos,

mientras que *M. bovis* tiene un espectro más amplio de especies hospedadoras, incluyendo bóvidos y humanos (Delogu et al., 2013) (Sanou et al., 2015)

Incluso entre las especies de *Mycobacterium* que se limitan más específicamente a los humanos, se pueden observar características genómicas, fenotípicas, clínicas y epidemiológicas muy diferentes. MTB y *M. africanum*, tienen genomas circulares que oscilan entre 4,38 y 4,42 Mb, mientras que el genoma de *canetti* es 10-115 kb más grande, representado el bacilo de la tuberculosis con el genoma más grande. Fenotípicamente, *M. canetti* forma colonias lisas, diferentes de todas las otras especies de MTBC, que producen colonias en bruto. *M. africanum* y MTB son microorganismos con un tropismo específico para los seres humanos y causan principalmente la tuberculosis pulmonar. MTB y *M. africanum* deben en general, hacer que la TB pulmonar activa se transmita de un huésped a otro mientras que la epidemiología de *M. canetti* es completamente diferente. Los casos clínicos siguen siendo raros y en su mayoría son formas extrapulmonares de TB. Hasta ahora, la transmisión interhumana no se ha demostrado. Todo esto sugiere la existencia de un reservorio ambiental (Sanou et al., 2015)

### **2.5.2 Aspectos Microbiológicos de *Mycobacterium Tuberculosis*.**

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* comprende a un grupo de especies micobacterianas de crecimiento lento *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium pinnipedii* capaces de causar TB tanto en humanos como en animales.

#### **2.5.2.1 Estructura.**

*M. tuberculosis* es un bacilo de 1-10 de largo<sup>25</sup> x 0,3 – 0,6 µm, inmóvil y no esporulado, aeróbico facultativo, ácido alcohol resistente por su resistencia a la decoloración de la fucsina

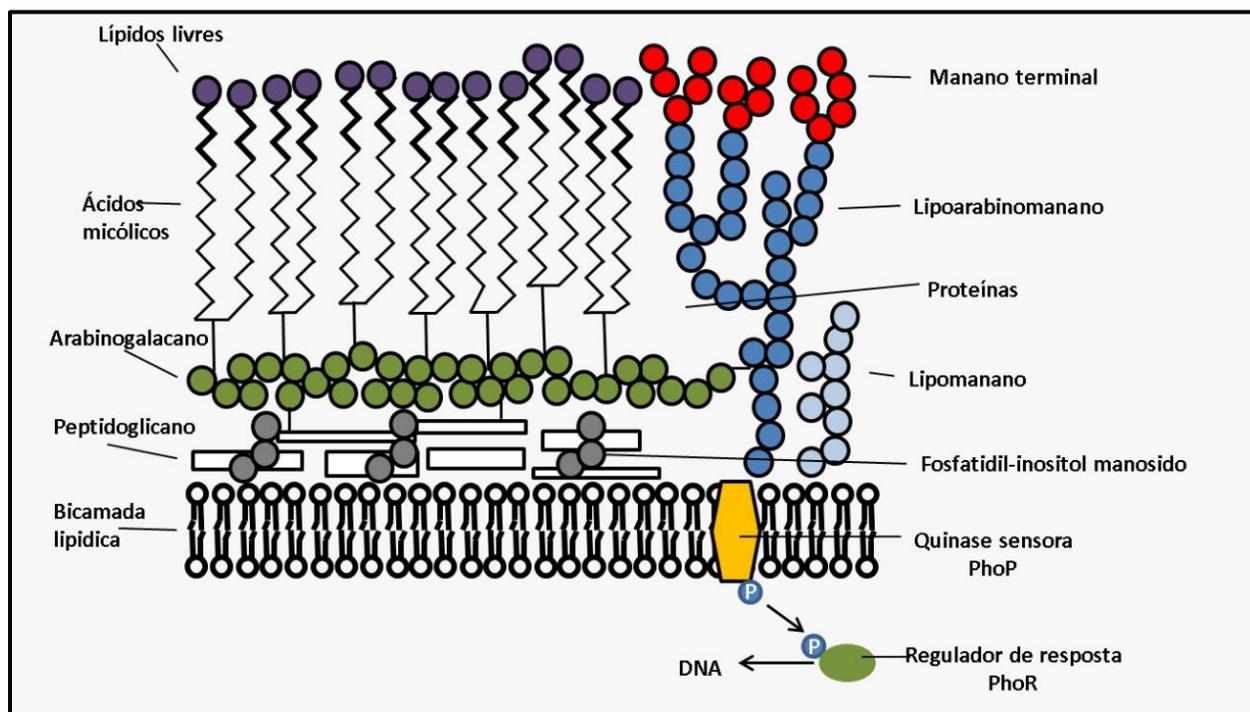
básica. Un rasgo característico de las micobacterias es la presencia de una envoltura celular que tiene un alto contenido de lípidos y comprende el 40% del peso de la envoltura celular.

#### ***2.5.2.1.1 Pared.***

Una característica importante de Mtb es la peculiar estructura de la pared celular, que proporciona una barrera impermeable excepcionalmente fuerte a los compuestos fármacos nocivos y desempeña un papel fundamental en la virulencia. Está compuesta por una membrana externa, que consiste en una bicapa lipídica asimétrica hecha de ácidos grasos largos en el prospecto interno, los ácidos micólicos, 2-alquilo, 3-hidroxi ácidos grasos de 60C-90C y de glicolípidos y componentes céreos, en la capa exterior. Las propiedades de los ácidos micólicos se reflejan en la fluidez y flexibilidad de la envoltura. La membrana externa e interna forman un espacio periplásmico, con la presencia de una capa delgada de peptidoglicano en el lado más interno unida covalentemente al arabinogalactano y al lipoarabinomano, que a su vez están unidos a los ácidos micólicos (Delogu et al., 2013) (Bailo et al., 2015) (Ghazaei, 2018) El peptidoglicano, el arabinogalactano y los ácidos micólicos forman el esqueleto de la pared celular. (*Fig. 4*).

**Figura 4**

Representación esquemática de la pared celular de MTB.



Nota. Fuente: Park, S. H., y Bendelac, A. (2000).

### 2.5.2.2 Características Morfológicas de la Observación Microscópica.

Con la coloración de Ziehl Neelsen se observan como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, rojo fucsia, destacándose claramente contra el fondo azul. Es muy difícil distinguir el bacilo de la tuberculosis de otras micobacterias por examen microscópico. Algunas micobacterias que no son *Mycobacterium tuberculosis* pueden aparecer como bastones muy largos o como bacilocos.

**Figura 5**

*Micobacterias en frotis de esputo teñido. Técnica de Ziehl-Neelsen*



Nota. Fuente: Tomado de Depto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

**2.5.3 Cultivo**

Es un microorganismo aerobio facultativo, cuyo desarrollo es óptimo a 35-37 °C. Con fines de aislamiento se emplean sobre todo medios sólidos a base de huevo coagulado, como el de Löwenstein-Jensen, que es el utilizado universalmente, y los semisintéticos con agar de Middlebrook y Cohn. Una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub> estimula su desarrollo. El bacilo *Mtb* es una micobacteria de crecimiento lento con un tiempo de duplicación de 12 a 24 h en condiciones óptimas, tardando varias semanas en dar colonias visibles en medios convencionales. Éstas son bastante características, de color crema, rugosas (<<en coliflor>>) y de superficie seca. Las colonias aisladas se identifican por la producción de niacina, por la reducción de nitratos, por poseer una catalasa termolábil y por ser resistentes a bajas concentraciones de hidracida del ácido tiofén-2-carboxílico. Actualmente existen sondas y otras técnicas genéticas que permiten una identificación directa de las colonias aisladas (Ruiz et al., 2006)

## 2.6 Genoma

La secuenciación del genoma completo del *M. tuberculosis* H37Rv fue publicada en 1998 identificando 3974 genes (actualmente 4011). El genoma comprende 4 411 529 pares de bases (pb) con un contenido de Guanina+Citosina (G/C) de 65,6%. El hecho de que la proporción G/C sea elevada a lo largo de todo el genoma, de una forma homogénea, no concentrada en regiones puntuales, denota que se trata de un genoma que no ha recibido el impacto de la transferencia horizontal de islas de patogenia. No obstante, se observan regiones con una proporción en G/C superior a la media y que son secuencias pertenecientes a una gran familia de genes que incluyen PGRSs (*polymorphic G+C-rich secuencias*) (Fontalvo\_Rivera y Gomez-Camargo, 2015)

## 2.7 Reservorio

*M. tuberculosis* no tiene una reserva ambiental conocida; los humanos son su única reserva conocida.

## 2.8 Vías de Transmisión

El bacilo se transmite, mayoritariamente por vía aérea por individuos con tuberculosis activa, cuando una persona tose, estornuda, habla o escupe, las gotitas de saliva que contienen bacilos tuberculosos se proyectan en el aire y pueden ser inhaladas por una persona cercana. Otras formas de transmisión más raras son: la vía digestiva, mediante el consumo de productos del ganado vacuno infectado; la vía urogenital, la vía cutáneo-mucosa, la transplacentaria y por inoculación accidental (laboratorio, autopsias) (SSA, 2009)

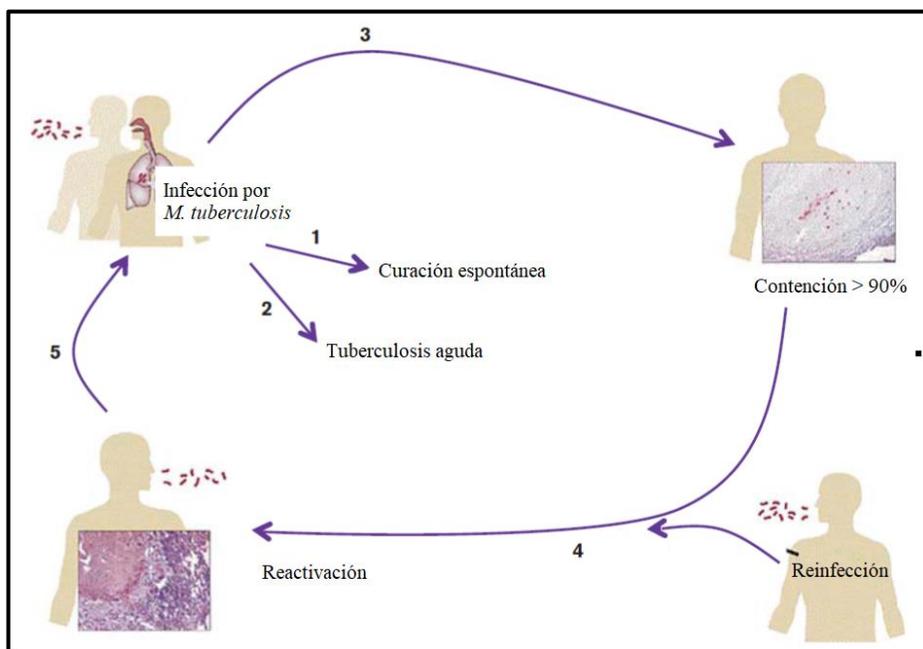
## 2.9 Patogenia.

### 2.9.1 Entrada del Bacilo

Al toser o expectorar, el enfermo con TB pulmonar activa, producen aerosoles contaminantes. Los bacilos en aerosoles infectados inhalados profundamente por un nuevo

huésped, alcanzan los alveolos. La infección comienza cuando *MTB* interactúa con las células objetivo del huésped. Las células diana son principalmente macrófagos, células dendríticas y neutrófilos reclutados (Tuyiringire et al., 2018)

Aquí, *MTB* es rápidamente fagocitado por los macrófagos alveolares profesionales que con mayor frecuencia pueden matar a las bacterias que ingresan gracias a la respuesta inmune innata. Si los bacilos pueden sobrevivir a esta primera línea de defensa, comienzan a replicarse activamente en macrófagos, difusos a las células cercanas, incluidas las células epiteliales y endoteliales. El éxito de la infección y el desarrollo de la forma pulmonar de la TB dependen de cuatro pasos sucesivos: la fagocitosis de los bacilos, su multiplicación intracelular, la fase latente contenida de la infección y, finalmente, la infección activa del pulmón. Estos pasos pueden progresar hacia diferentes escenarios clínicos: curación espontánea, enfermedad, infección latente y reactivación o reinfección (**Fig. 6**) (Sanou et al., 2015)

**Figura 6***Escenarios clínicos de MTB.*

Nota. MTB ingresa al huésped por inhalación de aerosoles. Son posibles diferentes escenarios: (1) eliminación inmediata de MTB por el sistema inmunitario pulmonar; (2) la infección progresa a tuberculosis activa; (3) la infección no progresa a una enfermedad activa y la MTB entra en una fase de latencia; (4) después de la fase de latencia, la MTB puede activarse después de la reactivación endógena o una nueva infección exógena o ambas; (5) En esta etapa, hay difusión y transmisión de MTB. (Tomado de Sanou et al., 2015).

### 2.9.2 Fagocitosis y Multiplicación Intracelular

Las micobacterias son capaces de bloquear la acidificación normal de los fagosomas mediante la prevención de la fusión fagolisosomal. Cuando el bacilo viable es fagocitado por el MA (macrófago alveolar), despliega su capacidad patógena secretando *6 kDa early secretory antigenic target* (ESAT-6). Este péptido es esencial para evitar la unión fagosoma-lisosoma y la apoptosis. Entonces, a través de la actividad del sistema de secreción ESX-1, *M. tuberculosis*

puede interrumpir la membrana fagosomal y, finalmente, permite la entrada del bacilo en el citoplasma. De esta manera, el bacilo aprovecha al máximo su capacidad de multiplicación en un único MA, aproximadamente entre 5 a 6 ciclos de división, para conseguir una concentración de entre 32 y 64 bacilos. Este proceso se desarrolla durante unos 5 a 6 días, considerando que cada ciclo de división en *M. tuberculosis* requiere alrededor de 24 horas, provocando la necrosis del MA. Entonces, los bacilos vuelven a convertirse en extracelulares y vuelven a ser fagocitados por el MA proveniente del espacio intersticial que substituye al necrosado, y por los MA de los alvéolos vecinos, que se alcanzan debido al drenaje constante generado por el movimiento de inspiración / espiración. El proceso se repite al menos una vez más, generándose hasta 1000 bacilos, provocando la suficiente generación de quimiocinas por parte de los MA infectados como para generar una respuesta inflamatoria (Ghazaei, 2018)

Con la inflamación, se rompe el equilibrio, al generarse un exudado a nivel capilar que destruye la estrechez del alvéolo y permite la entrada de células polimorfonucleares (PMN), normalmente neutrófilos y monocitos, en proporciones que dependerán del tipo de quimiocinas y citoquinas segregado por los MAs. Al mismo tiempo, permite un lavado más enérgico de los alvéolos afectados, drenándose hacia los nódulos linfáticos a través de los capilares linfáticos aferentes. De esta manera es como *M. tuberculosis* infecta en primer lugar a los macrófagos de los nódulos, generando una linfadenitis, y a las células dendríticas (**Fig. 7**) (Cardona P. J., 2018)

Estudios experimentales han demostrado que el tipo de muerte celular (apoptosis versus necrosis) que experimentan los macrófagos infectados es crucial, no sólo para la respuesta innata a la infección sino también para la respuesta inmune adaptativa subsiguiente (Pai et al., 2016)

### **2.9.3 *La Etapa Ganglionar: Inducción de la Respuesta Inmune***

A medida que se establece la infección primaria, las células dendríticas infectadas o los monocitos inflamatorios transportan *M. tuberculosis* a los ganglios linfáticos pulmonares para el cebado de las células T. Las células dendríticas presentan epítomos que corresponden principalmente a los antígenos secretados más abundantes: ESAT-6 y el complejo antígeno 85 (Ag85 A, B o C). Este último es responsable de la construcción de la pared celular, ya que permite el ensamblaje de dos moléculas esenciales: el arabinogalactano micolato y la trehalosa dimicolato. La presentación antigénica estimula esencialmente las células T CD4, cuyo subtipo depende del tipo de quimiocinas y citoquinas que transportan el líquido linfático drenado, y que son esencialmente Th1, Th2, Th17 o T reg. Las células T CD8 también se pueden generar en una escala más pequeña. En general, el subtipo dominante es Th1, responsable de generar interferón gamma, que permite que la activación de los macrófagos infectados (Pai et al., 2016)

### **2.9.4 *Respuesta Inmune***

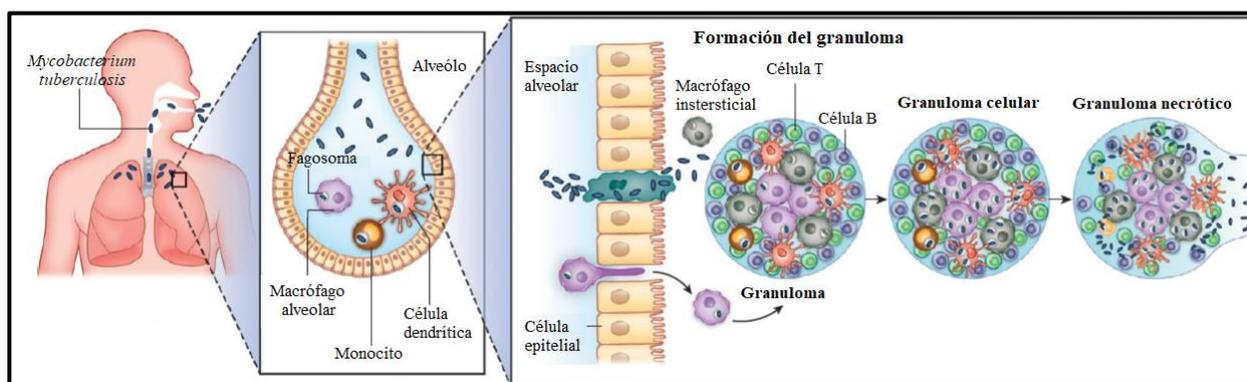
La inmunidad innata se refuerza con la inmunidad celular activada a través de la liberación de quimiocinas como el interferón gamma, el factor de necrosis tumoral, las interleucinas y los factores de crecimiento tumoral. (Tuyiringire et al., 2018)

La activación de la inmunidad celular puede resultar en la contención de más del 90-95% de la replicación bacteriana. Por lo tanto, el estado de la enfermedad (infección activa) y la latencia se definen por el estado de inmunidad del huésped. En los sujetos inmunocompetentes, en la mayoría de los casos, la proliferación de células Th1 específicas contra la infección tiene lugar a tiempo para prevenir el desarrollo de ATB. Las células Th1 se drenan a través de los vasos eferentes para incorporarse a la circulación pulmonar y se dirigen principalmente hacia los focos infecciosos, dado que la inflamación permite una mayor probabilidad de atracción. Las células Th1 entran en

contacto con los macrófagos infectados y, a través de la síntesis de interferón gamma, los activan, lo que permite que la mayoría de los bacilos se destruyan. La exposición a *M. tuberculosis* puede resultar en la eliminación del patógeno, ya sea debido a respuestas inmunitarias innatas o a la inmunidad adquirida de las células T. De la gran eficiencia protectora de la inmunidad celular, puede ocurrir, que un pequeño porcentaje logre entrar en una fase de ralentización o inactividad metabólica, lo que les permite sobrevivir manteniendo una actividad metabólica mínima.<sup>4</sup> La activación inmune resulta en el reclutamiento de linfocitos y macrófagos adicionales que se ensamblan en un granuloma (Tuyiringire et al., 2018)

## Figura 7

### Formación del granuloma



Nota. Fuente: Kosh, A., y Mizrahi, V. (2018).

### 2.9.5 Granuloma

Un granuloma se describe como una estructura multicelular que secuestra las bacterias infectantes del tejido circundante e inhibe aún más la tasa de replicación de los bacilos. El interior del granuloma se ha descrito como necrótico (o “caseoso”) e hipóxico. Estos granulomas llamados granulomas tuberculoides están compuestos de fagocitos infectados en forma de “nido” con una capa de células gigantes activas y macrófagos que los rodean. La capa más externa comprende

linfocitos y fibrosis. (**Fig. 8**) Hay varios tipos de granulomas que se pueden encontrar entre humanos y primates no humanos, incluso dentro del mismo individuo.

La formación de granuloma está vinculada a la limitación de la enfermedad, ya que varias células asociadas con la inflamación protegen rodeando a los patógenos para sofocar la propagación y la posterior transmisión de la bacteria. Además, se observa que la disposición del granuloma permite que las bacterias vivas se mantengan alejadas de las células inmunes, como los macrófagos que activan las células T citotóxicas. Esto también facilita el desarrollo y la evolución constantes de los patógenos dentro de tales granulomas (Sanou et al., 2015)

### **2.9.6 Mecanismo de TB Latente**

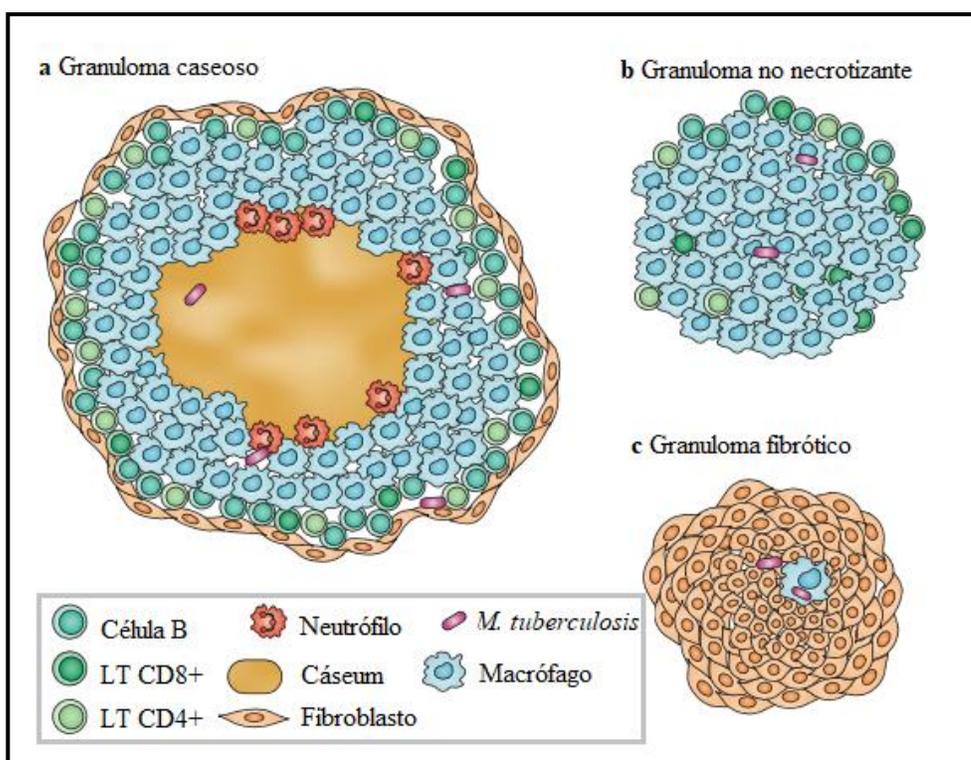
*Mtb* detecta el ambiente áspero en macrófagos y granulomas, caracterizado por un bajo agotamiento de oxígeno y nutrientes, y responde activando un estado latente, donde los bacilos dejan de multiplicarse, regulan negativamente el metabolismo central y activan el metabolismo anaeróbico, con inducción de proteínas de estrés que proporcionan *Mtb* con características biológicas e inmunológicas únicas. Estos bacilos inactivos metabólicamente activos pero que no se replican pueden persistir durante mucho tiempo *In vivo* y puede volver a un estado activo gracias a los factores promotores de la reanimación (rpf), que actúan sobre el peptidoglicano para desencadenar una cascada de eventos que promueven el crecimiento bacteriano (Delagou et al., 2013)

En la mayoría de los individuos que se infectan con *M. tuberculosis*, se produce una infección latente. Durante la infección latente, se establece un equilibrio dinámico entre los bacilos y las respuestas inmunitarias del huésped. Cualquier evento que debilite la inmunidad mediada por células puede llevar a la replicación bacteriana activa, el daño tisular y la enfermedad.

La tuberculosis latente se define por la ausencia de síntomas clínicos, pero conlleva un riesgo de progresión posterior a una enfermedad clínica, particularmente en el contexto de la coinfección con VIH, la terapia anti TNF para otras enfermedades y la diabetes, y puede disminuir con la terapia preventiva prolongada con isoniazida (Barry et al., 2009)

## Figura 8

### *Granulomas tuberculosos*



Nota.

A. El granuloma tuberculoso clásico, que se encuentra en la enfermedad activa y la infección latente, es el granuloma caseoso, compuesto de macrófagos epitelioides, neutrófilos, un manguito de linfocitos (Células T CD4 y CD8, células B), y a veces, rodeado de fibrosis periférica. El centro de este tipo de granuloma es caseoso, un estado necrótico que probablemente consiste en macrófagos muertos y otras células. Esta zona

es hipóxica. Las micobacterias en este granuloma se pueden encontrar en macrófagos (ya sea en contacto con las células T o no) o en el centro hipóxico, o posiblemente incluso en el borde fibrótico, lo que conduce a diferentes microentornos para la bacteria.

- B. El granuloma no necrotizante generalmente se observa en la enfermedad activa y consiste principalmente en macrófagos con algunos linfocitos, esta lesión se puede observar en cobayas y ratones, aunque con más linfocitos. Los bacilos de *M. tuberculosis* se encuentran dentro de los macrófagos en esta lesión.
- C. Las lesiones fibróticas se observan principalmente en la tuberculosis latente pero también en la enfermedad activa, y están compuestas casi por completo por fibroblastos, con un número mínimo de macrófagos. Aunque es posible cultivar bacilos de algunas lesiones fibróticas, no está claro dónde residen los bacilos, tal vez en macrófagos o en el área fibrótica, o como es el microambiente

Fuente: Barry et al. (2009).

### **2.9.7 Tuberculosis Pulmonar Activa**

Si el macrófago infectado no puede contener la replicación de *M. tuberculosis*, se produce una enfermedad inflamatoria granulomatosa. Aquí, macrófagos adicionales rodean a los macrófagos infectados y se fusionan para generar una célula gigante multinucleada. Se ha encontrado que las lesiones tuberculares humanas maduras consisten en una zona central de tejido necrótico caseoso bordado por linfocitos T, macrófagos y un área que también incluye agregados de células B. La inflamación en curso puede llevar a una remodelación de la arquitectura pulmonar, que se manifiesta como fibrosis extensa, cavitación, bronquiectasias de tracción, broncoestenosis o destrucción pulmonar parenquimatosa. La patología causada por la TB produce un deterioro significativo de la función pulmonar, mediada por un volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV 1) <60% previsto en el diagnóstico.

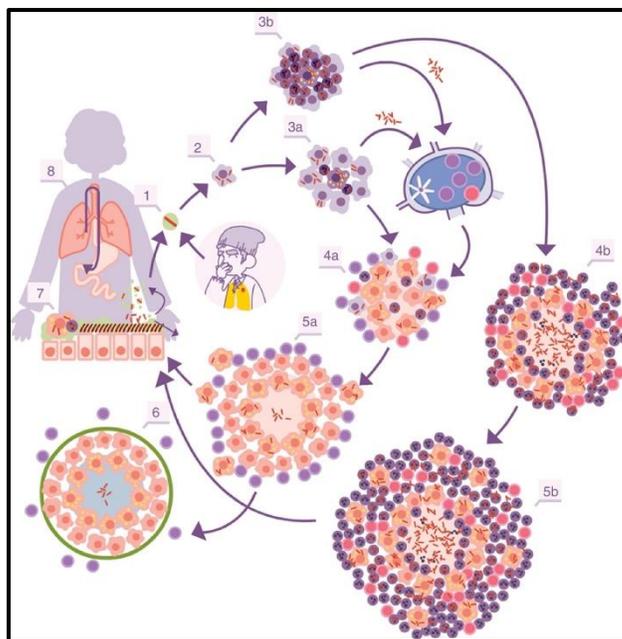
### **2.9.8 *Diseminación Extrapulmonar***

La infección con TB no se limita a los pulmones solamente. La infección latente y activa se puede propagar a los órganos extrapulmonares. Los bacilos pueden estar localizados en diferentes compartimentos/tejidos del huésped y se propagan a través de la sangre y vías linfáticas.

Cuando se produce linfadenitis, puede progresar y liberar los bacilos hacia los capilares eferentes, que llegan a la vena cava y pasan a la aurícula y ventrículo derechos para ser transportados una vez más hacia los pulmones. Pueden recolonizar lesiones generadas previamente, que, como están en un proceso de inflamación, tienen mayor vascularización y permeabilidad. Finalmente, estos bacilos pueden simplemente pasar a los capilares venosos, llegar a la aurícula y ventrículo izquierdos y diseminarse sistémicamente. Otra vía de diseminación común es la que se genera al drenar el propio bacilo a través del líquido alveolar, lo que le permite ingresar a la cavidad faríngea y penetrar en la membrana mucosa, a través de pequeñas heridas, que afectan ganglios linfáticos cervicales; o causar ATB intestinal en el caso de que la acidificación gástrica no sea suficiente para destruir el bacilo. El bacilo puede potencialmente colonizar cualquier órgano. Esto está vinculado a las características de vascularización. Los sitios más comunes de enfermedad pulmonar extra son la pleura, los tejidos linfáticos secundarios, el tracto genitourinario, el sistema esquelético, el tracto gastrointestinal, las meninges y el sistema nervioso central (SNC). La tuberculosis extrapulmonar más importante incluye, Sistema nervioso central y tuberculosis miliar. El ATB extrapulmonar a menudo indica un retraso en la respuesta inmunitaria, que afecta principalmente a niños menores de 5 años o personas con inmunodepresión. (Cardona P. J., 2018)

### **Figura 9**

*Ciclo infeccioso de Mycobacterium tuberculosis*



Nota. Entrada de bacilos en el alvéolo pulmonar a través de una gota de aerosol. 2. Fagocitosis por un macrófago alveolar y su posterior multiplicación. 3. Destrucción del macrófago alveolar, diseminación local de *M. tuberculosis*, fagocitosis por otros macrófagos alveolares y generación de una respuesta inflamatoria local dominado por monocitos (3a) o células PMN (3b), gracias a las cuales los bacilos pueden drenarse hacia el ganglio linfático regional, donde proliferan los linfocitos Th1 o Th17. 4. Los linfocitos son atraídos por la respuesta inflamatoria de las lesiones y activan los macrófagos alveolares infectados o atraen más células PMN, dependiendo de si la respuesta inmune es Th1 (4a) o Th17 (4b), respectivamente. En el primer caso, hay un control de la población bacilar y los bacilos latentes se drenan a través de los macrófagos de espuma (5a) hasta que se controla mediante la encapsulación de la lesión (6). En el segundo, las lesiones continúan creciendo de tamaño gracias a la entrada de células PMN y al crecimiento bacilar extracelular en la NET, generando nuevas lesiones periféricas. En este caso, la concentración bacilar es mucho mayor y, desde aquí, el drenaje es mucho más significativo, ya sea a través del líquido alveolar o a nivel sistémico mediante la neovascularización del granuloma (5b). En los pulmones, los bacilos en el líquido alveolar (7) tienden a drenarse hacia el tracto gastrointestinal (8), aunque pueden formar parte de nuevos aerosoles, generando nuevas lesiones (1)

Fuente: Cardona, P. J. (2018).

## 2.10 Aspectos Clínicos de Tuberculosis Pulmonar

La exposición a *M. tuberculosis* conduce con poca frecuencia a la enfermedad sintomática. Por lo tanto, aunque la estadística de que un cuarto de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* suena alarmante, solo alrededor del 12% de estos individuos inmunosensibles desarrollan realmente la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad es una función de la inmunocompetencia del huésped. Debe tenerse en cuenta que las personas con mayor probabilidad de sufrir tuberculosis activa (ATB) son aquellas que han estado continuamente en contacto con un caso de ATB, es decir, más de seis horas al día durante un período que depende del retraso en el diagnóstico (Cardona P. J., 2018)

### 2.10.1 *Sintomatología*

**2.10.1.1 Tuberculosis Pulmonar.** Los síntomas de la tuberculosis pulmonar activa incluyen tos, fatiga, falta de apetito, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso y producción de esputo con sangre (hemoptisis en la enfermedad avanzada), dolores de tórax. Los síntomas más característicos de la tuberculosis pulmonar son la tos y la expectoración persistentes por más de 2 semanas. A las personas con estos síntomas se les llama Sintomáticos Respiratorios (SR) (OPS, 2008)

**2.10.1.2 Tuberculosis Extrapulmonar.** La sintomatología depende de la localización.

**2.10.1.3 Tuberculosis Diseminada.** Compromete más de 2 órganos. Hay gran deterioro del estado general, hipertermia, disnea, astenia e incluye signos clínicos de aquellos órganos que pueden estar afectados: derrame pleural, trastornos digestivos, hematológicos (anemia, linfopenia, trombocitopenia), hepatoesplenomegalia y a veces signos meníngeos. En las evoluciones crónicas se observa compromiso del estado general y fiebre de origen desconocido. En las formas agudas puede presentarse como síndrome del distrés respiratorio del adulto (Aidar et al., 2010)

### 2.11 **Diagnóstico**

La prevención de la transmisión de *M. tuberculosis* se basa en un diagnóstico preciso y rápido. Las pruebas de diagnóstico actualmente disponibles para la tuberculosis activa y latente son una mezcla de tecnologías antiguas y nuevas.

### 2.11.1 *Detección de Tuberculosis Activa*

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, se considera caso de tuberculosis confirmado a la persona en quien se ha identificado por laboratorio el complejo *Mycobacterium tuberculosis* en cualquier muestra biológica ya sea por cultivo, baciloscopia o por métodos moleculares [Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o amplificación de RNA] o mediante cultivo de fragmento de tejidos, fluidos o secreciones de órganos de pacientes con manifestaciones clínicas, radiológicas y datos epidemiológicos compatibles con la enfermedad. Toda muestra de tejido u órgano para examen histopatológico, además de someterse a este estudio, una fracción se debe enviar al servicio de bacteriología, para el aislamiento e identificación de *M. tuberculosis* mediante cultivo

Para que el laboratorio pueda obtener resultados confiables no sólo es necesario que ejecute las técnicas correctamente. También necesita una buena muestra, entendiéndose por tal la que proviene del sitio de lesión que se investiga, obtenida en cantidad suficiente, colocada en un envase adecuado, bien identificada, conservada y transportada

**La muestra.** La muestra más examinada es el esputo debido a que, como se ha mencionado, la tuberculosis pulmonar es la más frecuente. Sin embargo, dado que la enfermedad puede manifestarse en cualquier órgano, con menor frecuencia puede requerirse la investigación de muestras muy variadas: orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido ascítico, sangre, pus de cavidades abiertas, biopsias. Estas muestras de lesiones extrapulmonares deben procesarse también por cultivo. La muestra de esputo mucopurulenta, proveniente del árbol bronquial, es la que asegura mayor probabilidad de que se puedan observar bacilos. (OPS, 2008)

### 2.11.1.1 Baciloscopia

La baciloscopia es la técnica de laboratorio que mediante la tinción de Ziehl Neelsen, preferentemente, permite observar en un frotis bacilos ácido alcohol resistentes, puede ser para detección, diagnóstico o control. El ácido alcohol resistencia es la propiedad que tienen las micobacterias de captar en su pared fucsina fenicada (de color fucsia) o auramina (amarillo fluorescente) y retenerla aun con la acción de decolorantes, como la mezcla de ácido y alcohol, característica que se debe a su alto contenido en lípidos, particularmente a los ácidos micólicos, que poseen en su pared celular. Así, utilizando una técnica adecuada es posible identificar al bacilo de la tuberculosis en la muestra del enfermo como un bacioncito rojo fucsia o fluorescente sobre una coloración de fondo que facilita su visualización. Esta propiedad no es específica del bacilo de la tuberculosis, sino que la tienen todos los bacilos del género *Mycobacterium*, aun las micobacterias ambientales y otros pocos microorganismos.

Para que la baciloscopía sea positiva es preciso que la muestra tenga como mínimo, entre 5.000 y 10.000 bacilos por mililitro de muestra. Este alto contenido de bacilos se encuentra en los pacientes con tuberculosis pulmonar, especialmente en aquellos con enfermedad avanzada y con lesiones cavitadas. Como la eliminación de los bacilos por el esputo no es constante, es conveniente analizar más de una muestra de cada SR para el diagnóstico de la tuberculosis. La primera muestra puede detectar aproximadamente el 80% de los casos positivos, la segunda agrega un 15% y la tercera un 5% más.

La coloración de Ziehl-Neelsen es la técnica más apropiada para ser utilizada. Es la recomendada por la OMS y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER) por ser la que asegura resultados reproducibles con un entrenamiento sencillo y la más económica.

**Tabla 2***Lectura de extendidos coloreados por Ziehl-Neelsen*

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

Nota. Fuente: OPS y OMS. (2008).

**Tabla 3***Informe de los resultados de la baciloscopia*

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

Nota. Fuente: OPS y OMS. (2008).

Se aconseja examinar por baciloscopia una muestra por mes de cada paciente de tuberculosis pulmonar con baciloscopia inicial positiva. Si la baciloscopia es negativa, coincidiendo con mejoría clínica y cumplimiento del tratamiento, se pasa a la segunda fase del tratamiento. Si por el contrario, la baciloscopia continua positiva, será enviada para cultivo para el

caso en que se requiera prueba de sensibilidad y se evaluará si el paciente puede pasar a la fase de continuación o si debe extenderse la primera fase (OPS, 2008)

#### **2.11.1.2 Cultivo.**

El estándar de oro para las pruebas de sensibilidad a los medicamentos ha sido el método de proporción de agar en medio Lowenstein.Jensen y agar Middlebrook 7H11. El cultivo produce resultados tardíamente, pero es más sensible que la baciloscopia. Puede evidenciar un mínimo de 10 a 100 bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) presentes en una muestra, si es realizado en forma adecuada. Permite identificar los casos antes de que lleguen a ser infecciosos. Mediante el cultivo es posible incrementar la confirmación del diagnóstico de tuberculosis en aproximadamente 15-20% de los casos y en 20-30% de los casos de tuberculosis pulmonar. Si se considera el total de casos con diagnóstico de tuberculosis pulmonar confirmado bacteriológicamente, la baciloscopia detecta el 70-80% y el cultivo 20-30% restante. Estas cifras están condicionadas por la situación epidemiológica (Jassal y Bishai, 2009)

Cuando es necesario priorizar el uso de recursos, el cultivo es reservado para los sintomáticos que no han podido ser diagnosticados por baciloscopia. Con este criterio, se siembran principalmente las muestras de sintomáticos adultos con enfermedad pulmonar poco avanzada, las de los niños y todas las muestras extrapulmonares.

El cultivo permite realizar la prueba de sensibilidad a los antibióticos, identificar a los casos que necesitan una reformatión de la quimioterapia y orientar la conformación de un nuevo esquema de tratamiento. El cultivo es el método de referencia con el que se tiene que evaluar todo nuevo método diagnóstico.

**Morfología de las colonias.** Las colonias de *M. tuberculosis* son habitualmente rugosas, sin pigmentación, y secas si se ha absorbido bien en el medio la humedad propia de la muestra y las soluciones utilizadas para procesarla.

*M. kansasii* es una micobacteria ambiental que puede tener colonias rugosas con aspecto parecido a *M. tuberculosis* pero evidencian pigmentación amarilla cuando los cultivos jóvenes son expuestos a la luz, son fotocromógenas.

**Tabla 4**

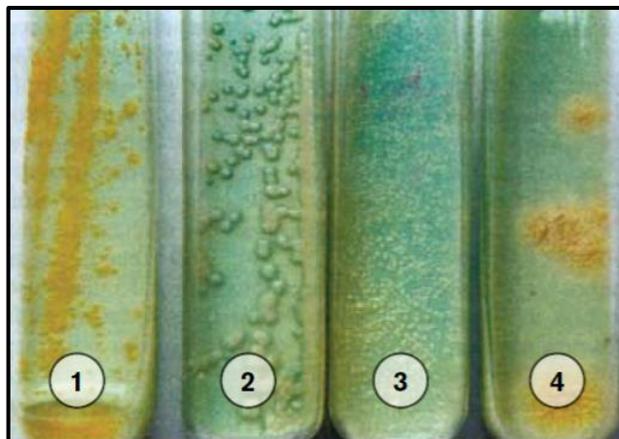
*Esquema de diferenciación de M. tuberculosis de las micobacterias ambientales*

	<i>M. tuberculosis</i>	Micobacterias ambientales
Velocidad de desarrollo	Lenta (a partir de la tercera semana luego de inoculada una muestra en medio a base de huevos)	Lenta o rápida
Aspecto macroscópico de la colonia	Rugosa No pigmentada	Lisa Pueden tener pigmentación
Aspecto microscópico de la colonia	Bacilos dispuestos en "cuerdas"	Bacilos muy largos y filamentosos o cortos, cocoides, mayormente desagregados
Niacina	Positiva	Negativa
Catalasa a 68 °C	Negativa	Positiva
Reducción de nitrato	Positiva	Positiva/negativa

Nota. Fuente: OPS y OMS. (2008).

**Figura 10**

*Cultivo en Löwenstein-Jensen*



Nota.

1. Micobacteria ambiental cromógena
2. Micobacteria ambiental de rápido desarrollo
3. Micobacteria ambiental de lento desarrollo
4. *Mycobacterium tuberculosis*

**Nota. Fuente:** OPS y OMS. (2008).

### **2.11.1.3 Pruebas de Biología Molecular.**

La identificación de las especies de micobacterias más frecuentes en muestras clínicas por medio de la hibridación con sondas de ácidos nucleicos específicas es muy precisa y aceptada en reemplazo a las pruebas bioquímicas. Consiste en amplificación de DNA o RNA de *M. tuberculosis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); se realiza en laboratorios de referencia certificados y es útil para el diagnóstico de TB extrapulmonar. La PCR identifica el DNA o RNA de *M. tuberculosis* en muestras clínicas o permite confirmar que los BAAR observados o aislados son efectivamente *M. tuberculosis*

Los ensayos de hibridación de sondas en línea junto con la amplificación de ácidos nucleicos ofrecen una vía prometedora para la identificación rápida de la resistencia a la isoniazida y la rifampicina. La prueba de diagnóstico rápido recomendada por la OMS para la detección de la tuberculosis y la resistencia a la rifampicina actualmente disponible es el ensayo Xpert MTB/RIF® (Jassal y Bishai, 2009)

Otros métodos moleculares que podrían usarse en la detección de cepas de tuberculosis farmacorresistentes incluyen, el análisis con Molecular Beacons, la estrategia de micobacteriófagos luciferasa, la huella dideoxi, la secuenciación directa de los productos de PCR y el análisis de heterodúplex. Estos métodos se describen como resultados rápidos y altamente sensibles

#### **2.11.1.4 Ensayo de Susceptibilidad a los Medicamentos de Observación Microscópica (MODS).**

Una forma particular de prueba que ha recibido mucha atención debido a su aplicación potencial en entornos con recursos limitados es el ensayo de susceptibilidad a los medicamentos de observación microscópica (MODS). Mediante el uso de un medio de cultivo líquido, el ensayo MODS depende de la observación microscópica de un patrón de cuerda (es decir, la agregación de los bacilos de la tuberculosis que forman estructuras de serpentina) que es exclusiva de *M. tuberculosis*. Se necesita una mediana de tiempo de solo 7 días (RIC de 6 a 8 días) tanto para la identificación de la enfermedad como para las pruebas de sensibilidad a los medicamentos (Jassal y Bishai, 2009)

### **2.11.1.5 Radiografías de Tórax.**

El control radiográfico se efectúa en adultos como estudio complementario, al inicio y al final del tratamiento, cuando exista el recurso. En niños es indispensable, si es posible, cada dos meses.

Las radiografías de tórax pueden ser útiles para el diagnóstico de tuberculosis intratorácica para precisar la localización y extensión de las lesiones, sobre todo en aquellos pacientes que reportan baciloscopias negativas o en pacientes pediátricos con sospecha de TB y PDD rector. A todo paciente con radiografía de tórax sugestiva de tuberculosis debe solicitarse tres baciloscopias. Las radiografías de tórax se deben utilizar cuando se disponga del recurso, especialmente en niños.

Sin embargo, las imágenes observadas en una radiografía torácica son inespecíficas, ya que pueden corresponder a otra patología, por ejemplo, a algunas neumonías por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, micosis invasoras, neoplasias, neumoconiosis, fibrosis quística, bronquiectasias, entre otras

### **2.11.1.6 Estudio Histopatológico.**

Se efectúa en todas las formas de TB en las que sea posible obtener tejido. En los casos de TB pulmonar, el tejido se obtiene mediante fibroncoscopia con biopsia transbronquial, toracoscopia o toracotomía. Se recomienda que el tejido se envíe de inmediato al laboratorio en solución salina estéril o salina al 0,9 % para frotis y cultivo, lo que incrementa la sensibilidad y especificidad. Los especímenes tomados de autopsias o postmortem reciben el mismo proceso para histopatología y cultivo (SSA, 2009)

### **2.11.2 Pruebas Inmunológicas para Diagnóstico de ITBL.**

El término ITBL (Infección por Tuberculosis Latente) se refiere a la presencia de MTB en el organismo sin signos y síntomas, o evidencia radiográfica o bacteriológica de TB. El diagnóstico de la ITBL se efectúa de forma indirecta a través de la detección de una respuesta inmunitaria celular específica frente a antígenos de la micobacteria en ausencia de datos clínicos sugestivos. Actualmente, existen dos tipos de ensayos clínicos para efectuar el diagnóstico de la ITBL: La prueba cutánea al PDD (Derivado Proteínico Purificado) y el IGRA (Del inglés *Interferon-gamma release assay*, ensayo de liberación de interferón-gamma).

#### **2.11.2.1 Prueba Cutánea de la Tuberculina.**

La prueba cutánea al PDD consiste en la inyección intradérmica de 5 unidades de derivado proteínico purificado en la cara lateral del antebrazo, contralateral a la vacuna BCG; la lectura de la reacción dérmica se realiza 48-72 horas después y una prueba se define como positiva en relación con el diámetro de la induración:  $\geq 5$  mm en pacientes inmunocomprometidos y en contactos recientes de casos con TBA,  $\geq 10$  mm en otros grupos de riesgo (pacientes oncológicos, desnutridos, entre otros) y  $\geq 15$  mm en grupos de bajo riesgo. En caso de obtener un resultado positivo se procede a descartar TBA o ITBL.

#### **2.11.2.2 Prueba IGRA.**

La prueba cutánea al PDD constituye un método *in vivo*, mientras que el IGRA consiste en una modalidad *ex vivo* basada en la detección de una respuesta inmunitaria específica frente a MTB, esto se lleva a cabo cuantificando la síntesis de citosinas por parte de los linfocitos Th1 luego de haber sido estimulados por antígenos específicos de la micobacteria. Anteriormente, el diagnóstico de la ITBL radicaba de forma exclusiva en el empleo de la prueba cutánea al PDD, la

cual sufre de una sensibilidad reducida en pacientes inmunocomprometidos así como de una pobre especificidad asociada a individuos con vacunación de BCG previa. En contraste, el IGRA es una prueba sanguínea desarrollada inicialmente para fortalecer el poder diagnóstico al ser capaz de identificar la respuesta inmunitaria celular frente a antígenos específicos de MTB, por ende, una prueba positiva constituye un diagnóstico de ITBL aun en ausencia de evidencia clínica y/o radiológica y brinda una especificidad del 98-100% y una sensibilidad del 70-90%. No obstante, cabe mencionar que el IGRA no cuenta con la sensibilidad y especificidad suficientes para confirmar o descartar la TBA y no son capaces de identificar acertadamente a los pacientes inmunocomprometidos (en sujetos con cuenta de CD4 menos a 200 células/ml) con riesgo de padecer TB (Orozco-andrade et al., 2015)

## 2.12 Tratamiento

El tratamiento farmacológico es la única terapia eficaz para la tuberculosis. Los fármacos se clasifican en tres grupos en función de las pruebas de eficacia, potencia y experiencia de uso.

- **Primera línea:** Se utilizan en el tratamiento primario de la tuberculosis: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, estreptomycin y etambutol. Los fármacos antituberculosos de primera línea son los más eficaces y ampliamente utilizados para el tratamiento de la tuberculosis sensible a los fármacos.
- **Segunda línea:** Se reservan para el tratamiento de bacilos resistentes al tratamiento de primera línea. Un medicamento puede ser clasificado como de segunda línea en lugar de primera línea por ser menos eficaz que los de primera línea (por ejemplo, el ácido para-aminosalicílico), tener efectos secundarios tóxicos (por ejemplo, cicloserina), o ser eficaz, pero no estar disponible en muchos países en desarrollo (por ejemplo, las fluoroquinolonas).

- **Tercera línea:** Los fármacos antituberculosos de tercera línea se caracterizan por ser menos eficaces (por ejemplo, claritromicina) o porque no se ha demostrado completamente su eficacia (por ejemplo, clofazimina) (Bailo et al., 2015)

Otra forma de clasificación es la de la tabla 5, el tratamiento se prescribe por el personal médico, se administra en cualquiera de sus formas, se distingue en primario acortado, retratamiento con fármacos de primera línea, retratamiento estandarizado con fármacos de segunda línea para TB-MDR y retratamiento individualizado con fármacos de segunda línea para TB-MDR, TB-XDR o de acuerdo al antecedente de tratamiento. Todos los tratamientos deben ser estrictamente supervisados por personal de salud.

Con un tratamiento antibiótico adecuado, alrededor del 90% de los pacientes seronegativos con tuberculosis sensible a los medicamentos puede curarse en 6 meses utilizando una combinación de rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB) durante 2 meses, seguida de una fase de continuación de cuatro meses de RIF e INH (fig.10) La razón principal para prescribir esta combinación de medicamentos en el tratamiento de la tuberculosis es que la probabilidad de aparición de múltiples bacterias resistentes a los medicamentos antituberculosos tienen diferentes modos de acción: INH es bactericida contra bacterias replicantes, EMB es bacteriostático en dosis bajas, pero se utiliza en el tratamiento de la tuberculosis en dosis bactericidas más altas, RIF es bactericida y tiene un efecto esterilizante, y PZA es sólo débilmente bactericida, pero muy eficaz contra bacterias localizadas en ambientes ácidos, dentro de macrófagos, o en áreas de inflamación aguda, donde entran en una condición no replicativa. Por lo tanto, la combinación de todos estos fármacos se dirige a todas las subpoblaciones de bacilos tuberculosos, es decir, las que se replican activamente y las que se

encuentran en estado no replicativo. Es importante destacar que sí un fármaco <<esencial>> no se puede usar por resistencia o toxicidad, debe ser reemplazado por otro con una acción similar (bactericida o esterilizante) (Caminero-Luna, 2016)

## Tabla 5

### *Clasificación racional y uso secuencial de los fármacos antituberculosos*

---

#### *Grupo 1: Fármacos de primera línea de administración oral<sup>a</sup>*

- Fármacos esenciales: isoniazida, rifampicina, pirazinamida
- Fármaco acompañante: etambutol

#### *Grupo 2: Fluoroquinolonas<sup>b</sup>*

- Altas dosis de levofloxaxino o moxifloxacino → todos son esenciales

#### *Grupo 3: inyectables<sup>b,c</sup>*

- Estreptomina, kanamicina, amikacina, capreomicina → todos son esenciales

#### *Grupo 4: Otros fármacos de segunda línea menos eficaces<sup>d</sup>*

- Etionamida/protionamida, cicloserina, PAS → todos son acompañantes

#### *Grupo 5: Otros fármacos con menor experiencia clínica<sup>d</sup>*

- Fármacos esenciales: linezolid, bedaquilina, delamanid
- Fármacos acompañantes: clofazimina, meropenem/imipenem amoxicilina/clavulánico

<sup>a</sup> Utilizar todos los posibles.

<sup>b</sup> Utilizar solo uno de ellos, pues tiene la misma o similar diana genética. Contarlo como fármaco activo en los casos de TB-MDR, pero añadirlo, sin contarlo como fármaco activo en la TB-XDR.

<sup>c</sup> Evitar estreptomina por su elevada tasa de resistencia asociada a isoniazida.

<sup>d</sup> Utilizar todos los posibles si son necesarios.

<sup>e</sup> Etionamida y protionamida son prácticamente el mismo fármaco.

PAS: ácido para-amino salicílico.

---

Nota. Fuente: Caminero-Luna, J. A. (2016).

**Tabla 6***Clasificación de tratamientos por grupo*

Nuevo	Paciente que nunca ha recibido tratamiento antituberculosis, o quien recibió el tratamiento por menos de un mes.
Recaída	Pacientes tratados anteriormente contra la tuberculosis que fueron clasificados en la categoría de curados o tratamientos terminados, y a quienes se les diagnostica TB-FR
Abandono	Pacientes que interrumpieron su tratamiento por uno o más meses y que vuelven a tratarse como TB-FR
Fracaso al tratamiento primario	Persistencia de bacilos en la expectoración, o en otros especímenes al final del 4° mes de tratamiento confirmado por cultivo, o a quien después de un período de negativización durante el tratamiento tiene baciloscopia positiva confirmada por cultivo.
Otro	Paciente que no encaja en las definiciones anteriores. Se incluyen en este grupo los tratados fuera de los programas TAES y aquellos de quienes se desconoce el resultado del último tratamiento

Nota. Fuente: Salud, S. d. (2009).

Los esquemas de tratamiento y retratamiento se pueden observar en la **figura 11** . En caso de que el enfermo suspenda el tratamiento por lo menos 30 días se considera abandono y deberá iniciar un retratamiento primario y bajo estricta supervisión médica. En el nivel 2 de retratamiento, debe indicarse sólo en caso de recaída o reconquista. En general, el registro de casos está dividido en grupos (**tabla 6**) y estos se definen en función de los antecedentes del tratamiento antituberculosis en el momento de la recolección de la muestra del esputo. (SSA, 2009)

En todos los pacientes con tuberculosis del sistema nervioso central, miliar (diseminada) u ósea, el tratamiento deberá administrarse durante 12 meses, en fase intensiva, dos meses con isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol o estreptomina y en fase de sostén 10 meses, intermitente, tres veces por semana con isoniazida y rifampicina.

En el tratamiento para niños menores de 12 años se indican fármacos separados y por kilo de peso sin pasar de las dosis máximas. El etambutol no tiene contraindicaciones y puede prescribirse desde 20 mg por kg

El objetivo del tratamiento es interrumpir la cadena de transmisibilidad de *MTB*, lograr la curación, prevenir las complicaciones y evitar la muerte. Deberá garantizarse el abasto de medicamento y su ingesta deberá estar supervisada por personas habilitadas. La evaluación del tratamiento se debe realizar con los criterios clínico, de laboratorio y baciloscópico mensual, realizando cultivo cada dos meses durante todo el tratamiento, y radiográfico cada seis meses.

**Figura 11***Pirámide de éxito de tratamiento*

**1ª línea:** Isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambuto (E), Estreptomicina (S).

**2ª línea:** Kanamicina (Km), amikacina (Am), capreomicina (Cm), etionamida (Eto), protionamida (Pto), ofloxacina (Ofx), levofloxacina (Lfx), moxifloxacina (Mfx) y cicloserina (Cs).

\*Utilizar sólo en caso de recaída o reconquista, si el paciente cumple criterios de fracaso.

Nota. Fuente: Nota. Fuente: Salud, S. d. (2009).

### 2.12.1 *Quimioprofilaxis (Terapia Preventiva)*

La quimioprofilaxis antituberculosa es la quimioterapia específica empleada con finalidad preventiva para evitar el desarrollo de la enfermedad en un sujeto sano con riesgo de padecer TB.

La administración de isoniazida a contactos y personas con alto riesgo y que lo requieran, con objeto de prevenir la infección primaria o el desarrollo de la enfermedad tuberculosa.<sup>8</sup> Según datos de la NOM-006-SSA2-2013 debe administrarse de la siguiente manera:

- Se administra durante 6 meses a los contactos menores de 5 años, con o sin antecedente de vacunación con BCG en quienes se haya descartado la tuberculosis.
- Se administra durante seis meses a los contactos de cinco a catorce años de edad, no vacunados con BCG, en quienes se haya descartado la tuberculosis.
- Se administra durante seis meses a los contactos de quince años de edad o más con infección por VIH o con otra causa de inmunocompromiso (por desnutrición o por administración de fármacos inmunosupresores); con la posibilidad de extensión a nueve meses, de acuerdo a criterio clínico y de recuperación inmunológica de la persona con VIH o SIDA; previamente se debe realizar estudio exhaustivo para descartar tuberculosis activa pulmonar o extrapulmonar
- El fármaco recomendado para el tratamiento de la tuberculosis latente es la isoniazida a dosis de 5 a 10 mg en adultos, por kg de peso por día, sin exceder de 300 mg en una toma diaria por vía oral, estrictamente supervisada.
- La terapia preventiva con isoniazida no está indicada en los casos de contactos de pacientes en quienes se sospecha o se ha confirmado tuberculosis multifarmacorresistente.

- Todos los pacientes que presenten inmunocompromiso, deberán ser valorados para la administración de terapia preventiva con isoniazida.

### 2.13 Isoniazida

**Nombres químicos:** Isoniazida; hidrazida del ácido isonicotínico; isonicotinohidrazida, piridina-4-carbohidrazida (nombre IUPAC)

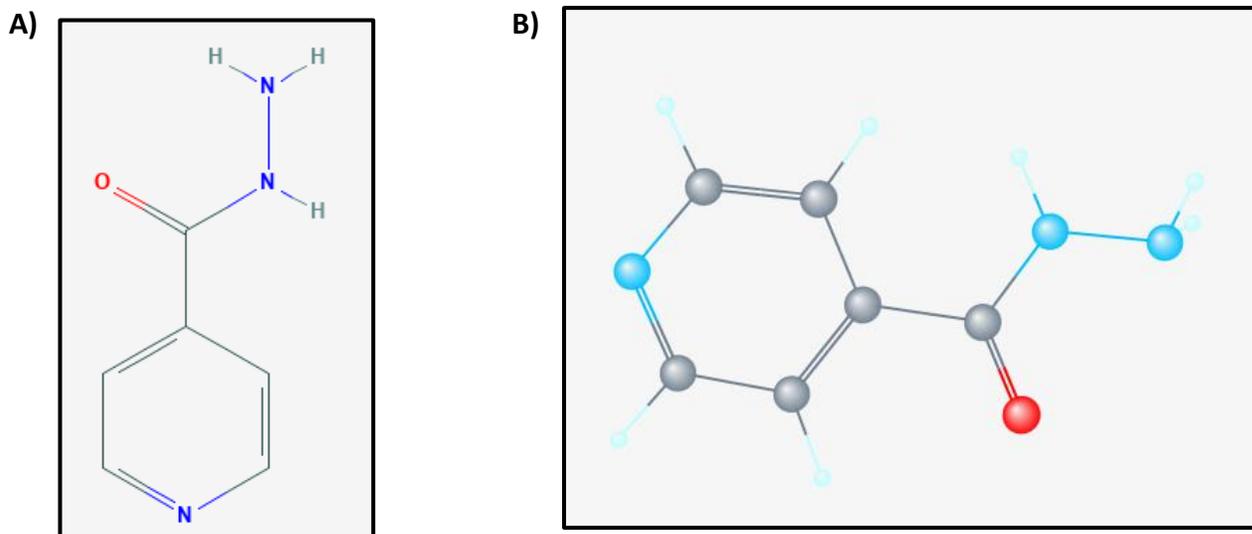
**Peso molecular:** 137.142 g/mol

**Fórmula molecular:** C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O

*Estructura molecular*

#### Figura 12

*Estructura molecular de inoniazida en 2D(A) y 3D(B).*



Nota: Fuente: Unidos, B. N. (2004).

### **2.13.1 Informe General**

La isoniazida, o hidracida del ácido isonicotínico, tiene un enérgico efecto bactericida contra los bacilos tuberculosos en multiplicación.

Se absorbe rápidamente y se difunde con facilidad en todos los humores y tejidos. La vida media en el plasma está determinada genéticamente y varía desde menos de una hora en acetiladores rápidos hasta más de tres en acetiladores lentos. En su mayor parte se elimina por la orina en un plazo de 24 horas, principalmente en forma de metabolitos inactivos.

### **2.13.2 Breve Historia**

Isoniazida fue descubierta en 1952. Este medicamento siguió a la estreptomycinina y al ácido paraaminosalicílico (PAS), que generalmente se conocen como los primeros antibióticos clínicos. La isoniazida (INH, hidrazida del ácido isonicotínico), conocida estructuralmente como piridina-4-carboxi hidrazida, ha sido el fármaco más utilizado desde su descubrimiento en 1952. Este medicamento fue descubierto por tres compañías farmacéuticas diferentes, BAYER (Leverkusen, Alemania), Hoffman LaRoche (Nutley, NJ, EE. UU.) y ER Squibb & Sons (Princeton, NJ, EE. UU.) y se demostró que inhibe la síntesis de la envoltura celular de *Mtb*. Teniendo en cuenta la importancia de la membrana celular en la patogenia de *Mtb*, INH curó a muchos pacientes y fue apodada “droga mágica”. Desde 1952, INH ha sido una droga esencial en la lucha contra la TB. Desde que se descubrió ha sido la piedra angular de todos los regímenes efectivos para el tratamiento de la enfermedad e infección latente de TB. (Tuyiringire et al., 2018)

### **2.13.3 Mecanismo de Acción**

INH es un profármaco con una concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0.05 µg/ml, que al ser captada por la bacteria, requiere la activación de la catalasa peroxidasa bacteriana

codificada por el gen *katG*. Al activarse se produce un radical acílico isonicotínico que se une a NAD<sup>+</sup> para formar un complejo INH-NAD. La INH activada inhibe la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) dependiente de la enoil-ACP reductasa (codificada por el gen *inhA*) del sistema de ácido graso sintasa tipo II, un actor clave en la vía biosintética del ácido micólico de *Mtb*. La inhibición de la biosíntesis del ácido micólico conduce a la lisis celular y a la muerte. La INH entra en la célula por difusión pasiva, pero su división se limita a la división de los bacilos en condiciones aeróbicas.

#### **2.13.4 Efectos Adversos**

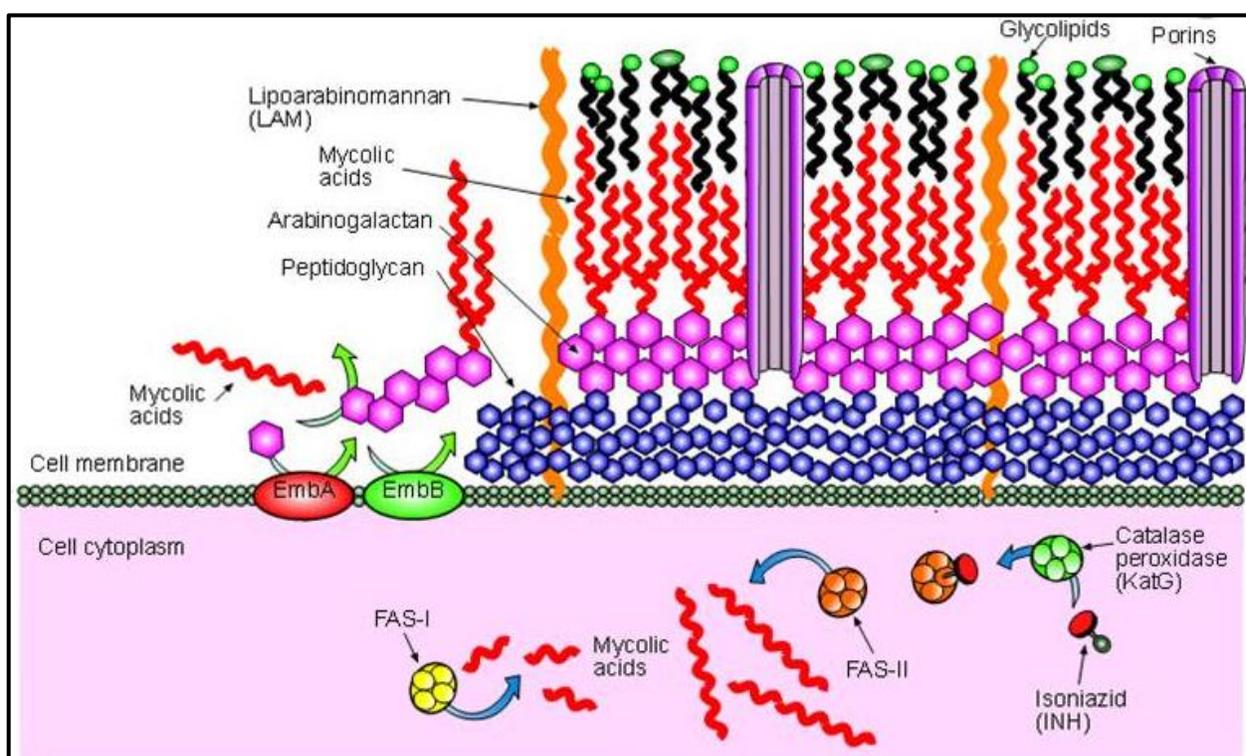
La isoniazida suele tolerarse bien a las dosis recomendadas. En ocasiones se producen reacciones de hipersensibilidad general o cutánea durante las primeras semanas de tratamiento.

El riesgo de neuropatía periférica se excluye administrando suplementos diarios de piridoxina a los pacientes vulnerables. En los sujetos susceptibles pueden aparecer formas menos comunes de trastornos neurológicos, entre ellos neuritis óptica, psicosis tóxica y convulsiones generalizadas, sobre todo en las últimas fases del tratamiento, que en ocasiones obligan a suprimir la isoniazida. (OMS, 1997)

La hepatitis es una reacción poco frecuente pero potencialmente grave que por lo general puede evitarse suspendiendo rápidamente el tratamiento. Más a menudo, se observa una elevación marcada de la concentración sérica de transaminasas hepáticas al principio del tratamiento, que no reviste, sin embargo, importancia clínica y que normalmente se resuelve espontáneamente durante el tratamiento. (Perdigão y Portugal, 2019)

### Figura 13

*Mecanismo de acción de INH.*



El antibiótico de primera línea isoniazida (INH) interfiere con la biosíntesis de la pared celular en *Mycobacterium tuberculosis*. La INH es un medicamento y se convierte en una forma activa por la catalasa peroxidasa (katG). La INH activada inhibe la acción de la enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA). La InhA es un componente enzimático importante del complejo

de ácidos grasos sintetasa II (FAS-II). FAS-II participa en la síntesis de ácidos micólicos de cadena larga. Los ácidos micólicos son componentes estructurales esenciales de la pared celular de las micobacterias y están adheridos a la capa de arabinogalactán.

Nota. **Fuente:** Immunopaedia.org ADVANCING GLOBAL IMMUNOLOGY EDUCATION. (2016).

## 2.14 Farmacorresistencia

La farmacorresistencia es un concepto microbiológico en el cual un microorganismo del complejo *M. tuberculosis* se confirma resistente por pruebas de fármaco sensibilidad *in vitro* a uno o más medicamentos anti tuberculosis de primera o segunda línea.

La TB resistente a los medicamentos no es un fenómeno reciente. Las cepas de *M. tuberculosis* que eran resistentes a la estreptomycin (SM) aparecieron poco después de la introducción del medicamento para el tratamiento de la TB en el año 1944, y en la actualidad, sigue siendo una de las principales preocupaciones y crisis de salud pública en muchos países: 558,000 fue el número estimado de personas con enfermedad resistente al menos a la rifampicina, el medicamento antituberculoso de primera línea más eficaz, en 2017. La gran mayoría de ellas tenían tuberculosis multirresistente, es decir, resistente a la rifampicina y a la isoniazida (otro de los principales fármacos antituberculosos de primera línea). China e India albergan al 40% de los pacientes que requieren tratamiento para la tuberculosis multirresistente, pero de los que no hay constancia que lo reciban.

La resistencia genética a un medicamento antituberculoso se debe a mutaciones cromosómicas espontánea de replicaciones micobacterianas a una frecuencia de  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$ . Los elementos genéticos móviles tales como los plásmidos y los transposones, que se sabe sirven para intermediar la resistencia a los medicamentos en diversas especies bacterianas, no lo hacen en *M.*

*tuberculosis*. Debido a que las mutaciones que resultan en la resistencia a los medicamentos no están relacionadas, la probabilidad de desarrollar resistencia bacilar a tres medicamentos utilizados simultáneamente llega a ser de  $10^{-18}$  a  $10^{-20}$ . En teoría, la posibilidad de presentar una resistencia a los medicamentos es, por ende, prácticamente inexistente cuando se utiliza una combinación de medicamentos eficaces para el tratamiento de la TB. La amplificación de la mutación genética antes mencionada por error humano resulta en una TB clínicamente resistente a los medicamentos. Lo que deja entonces, que la base de la resistencia a los medicamentos para la tuberculosis, es la selección de mutantes bacterianos con resistencia innata a la quimioterapia. Las epidemias de enfermedad resistente a los medicamentos se pueden generar mediante tres mecanismos interrelacionados: 1) La conversión de cepas susceptibles a bacterias de tipo salvaje en cepas resistentes a los medicamentos durante el tratamiento (resistencia adquirida); 2) aumento del desarrollo de resistencia en cepas resistentes a los medicamentos debido a una quimioterapia inadecuada (resistencia amplificada); y 3) transmisión de casos de farmacorresistencia (resistencia transmitida) (Jassal y Bishai, 2009)

La monoterapia, el suministro irregular de medicamentos, la mala calidad de los mismos, la prescripción inadecuada, la mala adherencia al tratamiento, la supervisión y el apoyo inadecuados por parte del personal sanitario pueden contribuir a la aparición y selección de cepas de bacilos tuberculosos resistentes a los medicamentos que pueden diseminar y causar tuberculosis resistente a los medicamentos. Debe sospecharse de farmacorresistencia en todo paciente con tuberculosis que curse con fracaso, recaída o abandono a un esquema de tratamiento primario. Se utilizan diferentes categorías para la vigilancia y el tratamiento a nivel mundial, los cuales se han definido dependiendo del patrón de resistencia del medicamento:

- **Monorresistencia:** Resistencia a solo un antituberculoso de primera línea.

- **Polirresistencia:** Resistencia a más de un antituberculoso de primera línea distinto de la isoniazida y la rifampicina.
- **TB multidrogorresistente (TB-MDR):** Son las cepas resistentes a INH y RIF, los dos medicamentos antituberculosos más potentes, requiere tratamiento con un régimen de segunda línea.
- **TB extremadamente resistente (TB-XDR):** Son cepas MDR (es decir, resistentes a INH y RIF) que también son resistentes al menos a un fármaco de las dos clases más importantes de medicamentos de un régimen de tuberculosis multirresistente: fluoroquinolonas y agentes inyectables de segunda línea (amikacina, capreomicina o kanamicina).
- **Cepas totalmente resistentes (TB-TDR):** Se refiere a las cepas que son resistentes a todos los medicamentos disponibles contra la tuberculosis. (Bailo et al., 2015)
- **Resistencia a la rifampicina (RR-TB):** Resistencia a la rifampicina detectada mediante métodos fenotípicos o genotípicos, con o sin resistencia a otros antituberculosos. Incluye cualquier resistencia a la rifampicina en forma de monorresistencia, polirresistencia, MDR o XDR.

Según el proyecto mundial de la OMS/USAID sobre vigilancia de TB-MDR, el factor asociado más importante es el paciente previamente tratado, los casos inicialmente tratados tienen la posibilidad de cualquier resistencia por lo menos cuatro veces mayor, y para polifarmacorresistencia, diez veces más en pacientes nunca antes tratados. En los enfermos crónicos (BAAR positivo después de un retratamiento), en los que han fracasado el tratamiento (BAAR positivo al final del cuarto mes), se multiplica el riesgo de farmacorresistencia; así como en los pacientes coinfectados con el VIH. (SSA, 2009)

Todos estos son casos de resistencia adquirida. Los mecanismos por los cuales las bacterias adquieren resistencia a los medicamentos son mecanismos de barrea (disminución de la permeabilidad/incremento del flujo), degradación/inactivación de enzimas, modificación de las vías involucradas en la activación/metabolismo del medicamento, y modificación de la diana del medicamento (mutaciones) o amplificación de la diana. El bacilo de la tuberculosis en particular es capaz de adquirir resistencia al fármaco mediante mutaciones espontáneas en genes cromosómicos que conducen a la modificación de la diana, la amplificación de la diana, la reducción de la capacidad de activación de los fármacos o el aumento de la capacidad de inactivación de los fármacos, no se ha informado de una transferencia horizontal de genes de resistencia. (Bailo et al., 2015)

#### **2.14.1 Resistencia a INH**

La resistencia a la INH es la forma de resistencia a medicamentos antituberculosos más común, ya sea sola o combinada con otros medicamentos. Según datos de la OMS, los promedios mundiales de resistencia a la isoniazida sin resistencia simultánea a la rifampicina fueron del 7,1% en los casos nuevos de tuberculosis y del 7,9% en los casos de tuberculosis previamente tratados. La proporción media de casos de TB-MDR con TB-XDR fue del 8,5%. Los aumentos recientes en la tuberculosis resistente a INH y multirresistente están comprometiendo la utilidad continua de este medicamento. Además, el desarrollo de la resistencia a INH es un primer paso común en la evolución a MDR y XDR.

La resistencia a la isoniazida es un proceso complejo. Se ha reportado en varios estudios que la resistencia a isoniazida está relacionada con mutaciones específicas en varios genes importantes de *Mycobacterium tuberculosis*, existiendo variantes genéticas. tales como *katG* (S315T, S315N, S315D, S315I, S315R, V61G, Q247H, A62T, G383A, C701G, G1388T, R128P,

N138H, N138D, N138S, A172T, G316D, W321G, L336P, R515C, D735A), *inhA* (S94A, I21V, I21T, I47T, I194T, 3, 258, 190) y su región promotora (-15 C-T, -8 T-C, T-A ó T-G, -17 G-T), *ahpC*, *nhd*, *oxyR*, *furA*, *fabG1*, entre otros. *KatG*, que codifica la enzima catalasa-peroxidasa; el gen *inhA*, que codifica una proteína involucrada en la extensión de ácidos grasos; el gen *ahpC*, que codifica la alquil-hidroperóxido reductasa C y el gen *oxyR*, un importante regulador del estrés oxidativo. Los principales mecanismos de resistencia a INH se pueden dividir en dos categorías: Primero, la prevención de la activación de INH puede obtenerse mutando los activadores de los fármacos, o mutando los reguladores de su expresión; en segundo lugar, la inhibición de *inhA* por el aducto INH-NAD puede superarse mediante mutaciones en *inhA* o en su región promotora. Existen otros mecanismos de resistencia tales como inactivadores de fármacos, alteración redox y bombas de eflujo. (Hazbon et al., 2006)

La resistencia a la INH generalmente se desarrolla debido a las mutaciones *katG* que disminuyen la capacidad de la catalasa-peroxidasa para convertir la INH a su forma activa. Dependiendo de las mutaciones encontradas, las mutaciones *katG* pueden dar lugar a una resistencia baja o alta. El nivel de resistencia está correlacionado negativamente con el resto de la actividad de la oxidasa *katG*. *KatG* es una proteína de 80 KDa, compuesta por 740 aminoácidos, es codificada por el gen *katG*, que se encuentra en una región relativamente inestable, haciéndolo susceptible de sufrir inserciones, deleciones y mutaciones. El gen *katG* está constituido por 2223 pb pares de bases<sup>62</sup>, en el cual se han reportado (según TB Drug Resistance Mutation Database) en diversas partes del gen un total de 273 mutaciones. Las mutaciones se concentran en una región codificante del gen *katG*, que comprende mayormente los codones 300 al 507 (102 mutaciones).<sup>39,60</sup> La mutación *katG* más frecuente es en el codón S315, donde cada base (AGC) puede mutarse para producir un residuo Ser315Arg (AGC/CGC), Ser315Leu (AGC/CTA),

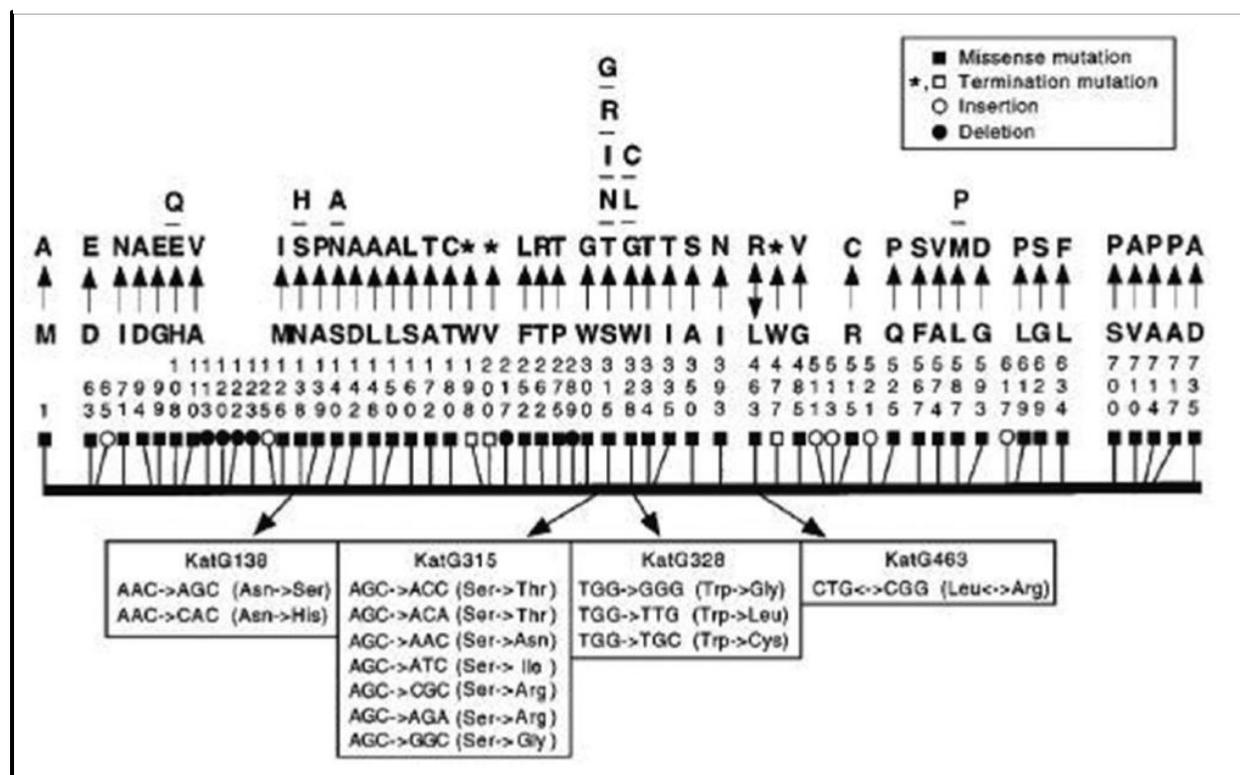
Ser315Gly (AGC/GGC), Ser315Thr (AGC/ACC), Ser315Ile (AGC/ATC), Ser315Asn (AGC/AAC), Ser315Thr (AGC/ACC), Ser315Thr (AGC/ACA), Ser315Thr (AGC/ACG), Ser315Arg (AGC/AGA), y Ser315Arg (AGC/AGG). La mutación más común encontrada en *katG315* es una sustitución de serina por treonina (S315T), que se encuentra en hasta el 64% de la resistencia fenotípica a la isoniazida global y se asocia con una resistencia intermedia a alta de la INH. Se ha demostrado que aunque *katG* (S315T) tiene actividades de catalasa-peroxidasa, S315T disminuye la actividad catalítica de *katG* y la afinidad de unión hacia INH. Otra de las más frecuentes es la sustitución del residuo de arginina 463 por leucina. (Hazbon et al., 2006) (Fontalvo\_Rivera y Gomez-Camargo, 2015)

Hasta ahora, se han reportado 273 mutaciones en *katG*, con CMI que varían de 0,2 a 256 mg/L. Se han observado mutaciones sin sentido, inserciones, eliminaciones, truncamiento y, más raramente, eliminación completa de genes.

Otro mecanismo importante de resistencia a la INH, generalmente en segundo lugar a las mutaciones *katG* son las mutaciones en *inhA*, o más frecuentemente en su región promotora. Se basa en la adquisición de mutaciones hipermórficas en la región promotora de *mabA(fabG1)-inhA* operón, generalmente en hasta un 32% de los aislados resistentes a la INH, la más común es -15C→T, y se ha encontrado más frecuentemente asociada con cepas mono-resistentes. El par de bases C-15T cambia en la región reguladora *inhA*, aumenta en 20 veces los niveles de mRNA *inhA*, lo que resulta en la sobreexpresión de *inhA*; esto conduce a una titulación de INH y, en consecuencia, un aumento de ocho veces en la CMI de INH en *M. tuberculosis*. Aunque tales mutaciones suelen dar lugar a una resistencia de bajo nivel de INH, se ha detectado una alta e inusual prevalencia de mutaciones promotoras de *inhA*, de hasta el 91%, en Lisboa, Portugal, y en el linaje *M. africanum* West-África. Además, las mutaciones dobles de *inhA* ORF/promotor pueden

llevar a la resistencia de la INH a niveles intermedios. Se han identificado numerosas mutaciones puntuales en *inhA* y su región promotora en aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH; sin embargo, no se han observado inserciones o eliminaciones de pares de bases. Las mutaciones en el gen *inhA*, no solo causa resistencia a la isoniazida, sino también a la ethionamida. Se han encontrado dos genes que participan en esta resistencia combinada de ethionamida-isoniazida. (Fontalvo\_Rivera y Gomez-Camargo, 2015)

Figura 14

Mutaciones en el gen *katG*

Mutaciones

A: Alanina C: Cisteína D: A-aspartico E: A. glutámico F: Fenilalanina G: Glicina H: Histidina I: Isoleucina M: Metionina N: Asparagina P: Prolina Q: Glutamina R: Arginina S: Serina T: Treonina W: Triptófano V: Valina. Tomado de Ramaswany S. 1998.

Estudios anteriores han encontrado diferencias de la distribución de mutaciones asociadas a la resistencia a isoniazida entre aislados monorresistentes de la de los aislados resistentes a múltiples fármacos. Registran que las mutaciones en *katG* 315 son más comunes en aislados resistentes a múltiples fármacos y las mutaciones en el promotor del gen *inhA* son más comunes en aislados monorresistentes.

Nota. Fuente: Hazbon et al. (2006).

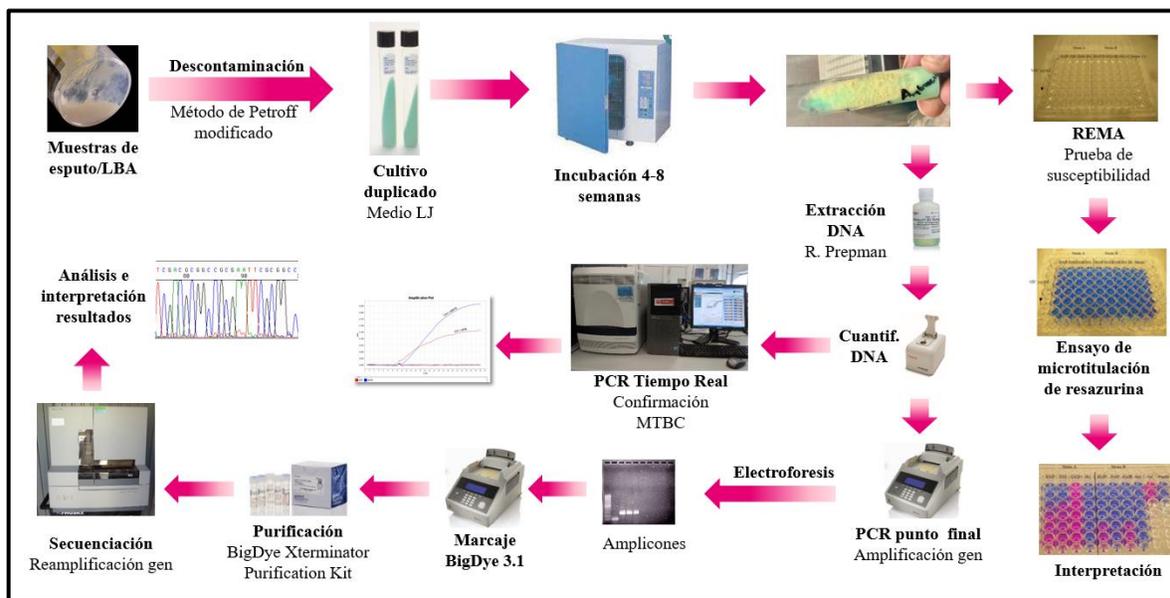
## Metodología

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina Humana "Dr. Manuel Velasco Suárez", perteneciente al Campus IV de la Universidad Autónoma de Chiapas, ubicado en la ciudad de Tapachula, Chiapas. A continuación, se detalla la estrategia general adoptada para el desarrollo del mismo.

### 3.1 Estrategia General

**Figura 15**

*Estrategia general*



**Nota** Para llevar a cabo este estudio, el procedimiento se desarrollará de la manera siguiente: se descontaminarán muestras de esputo/LBA utilizando una versión adaptada del método de Petroff y, seguidamente, se sembrarán en duplicado en medio de Lowenstein-Jensen. Las muestras se incubarán a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante un lapso de 4 a 8 semanas. Se realizará la extracción de ADN de los cultivos obtenidos y se verificará su correspondencia con el complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante la técnica de PCR en Tiempo Real. En cuanto a la evaluación de la sensibilidad a antibióticos de primera línea, se empleará el método REMA,

inoculando colonias seleccionadas en placas de microtitulación de 96 pozos. Estas se mantendrán a 37 °C por un período de 7 días y posteriormente se les aplicará resazurina entre las 24 y 48 horas para su evaluación. A partir de las extracciones de ADN, se procederá a amplificar la región de interés específico mediante PCR convencional. Los productos de amplificación serán nuevamente amplificados utilizando adaptadores M13 como cebadores, para su consecuente purificación, secuenciación y análisis genético.

### **3.2 Universo de Estudio**

Cada individuo que recibió un diagnóstico de tuberculosis y que visito la Clínica de Tuberculosis del Hospital Regional de Alta Especialidad "Ciudad Salud", situado en Tapachula, Chiapas [ la cual brinda atención médica a la Región X Soconusco de dicho Estado, fue incluido en el estudio durante el periodo comprendido entre septiembre de 2023 a febrero de 2024]

### **3.3 Población de Estudio**

En este estudio, se recopilaron muestras de esputo de individuos recién diagnosticados con tuberculosis pulmonar y que obtuvieron un resultado positivo en la prueba de baciloscopia, quienes fueron referidos a la Clínica de Tuberculosis del Hospital Regional de Alta Especialidad "Ciudad Salud", antes de que comenzaran el tratamiento antituberculoso.

Se realizó una evaluación de los pacientes que cumplían con los requisitos de inclusión para determinar su elegibilidad y se verifico que hayan entendido y aceptado el consentimiento informado. Solo los pacientes que otorgaron su firma en el consentimiento informado fueron considerados aptos para participar en el estudio, asegurando que se siguieran las normativas de buenas prácticas clínicas, así como respetando la confidencialidad y el anonimato de los participantes. Todo ello en conformidad con los principios éticos de la Declaración de Helsinki y los mandatos del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, tal como se especifica en el Artículo 16.

### 3.4 Tipo de Estudio

Observacional, prospectivo y transversal

### 3.5 Criterios de Selección

#### 3.5.1 *Criterios de Inclusión*

- Sujetos adultos
- Sexo indistinto
- Comorbilidad indistinta
- Sin inicio de tratamiento antituberculoso

#### 3.5.2 *Criterios de Exclusión*

- No desea participar en el estudio

#### 3.5.3 *Criterios de Eliminación*

- Obtención de muestra de esputo insuficiente o contaminado

### 3.6 Procesamiento de Muestras Clínicas

El esputo obtenido de cada paciente se envió al Laboratorio de Investigación en Ciencias Biomédicas de la Escuela de Medicina Humana “Dr. Manuel Velasco Suárez”, de la Universidad Autónoma de Chiapas, dentro de las primeras 24 horas tras su recolección, manteniéndose refrigerado durante el transporte. En el laboratorio, estas muestras se procesaron para su descontaminación empleando una versión adaptada del método de Petroff, y se manejaron en una cabina de seguridad biológica de Flujo Laminar con un nivel de bioseguridad 2.

### 3.6.1 Cultivos en Medio Löwenstein-Jensen

A partir de las muestras de esputo descontaminadas, se inocularon por duplicado en medios de cultivo inclinados de Löwenstein-Jensen suplementado con reactivo de Gruft e incubados a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 8 semanas máximo.

### 3.6.2 Método de Petroff Modificado: Procedimiento para la descontaminación del esputo usando hidróxido de sodio y N-acetil-L-cisteína

- El agente mucolítico, NALC, se usó para la digestión rápida del esputo y esto permitió que los agentes descontaminantes como el NaOH, se usaron a una concentración más baja (en el esputo) del 1%.
- El NaOH y el citrato de sodio pueden mezclarse en proporción 1:1 (**Cuadro 1**), esterilizado y almacenado en una botella estéril con tapón de rosca para su uso. Después de que se agregó NALC, el volumen preparado de digestivo se debió usar dentro de las 24 h, ya que NALC pierde la actividad mucolítica en reposo durante mucho tiempo.

**Tabla 7**

*Preparación de solución de Hidróxido de Sodio-N-Acetil-L-Cisteína*

Volumen (ml) de solución digestiva necesaria	Mezclar la cantidad indicada (ml) de:		Agregar NALC (g)
	NaOH 4%	Citrato de Na 2H <sub>2</sub> O 2.9%	
<b>50</b>	25	25	0.25
<b>100</b>	50	50	0.50
<b>200</b>	100	100	1.00
<b>500</b>	250	250	2.50
<b>1000</b>	500	500	5.00

- A partir de una muestra de esputo (lavado bronquial de ser necesario) recolectado en un contenedor estéril y bien rotulado con los datos necesarios, se transfirió un volumen máximo de 3-5 ml de muestra a un tubo de centrifuga estéril de 50 ml (tubo graduado y sin generar aerosoles).
- Agregando el mismo volumen de solución de citrato de sodio NALC-NaOH asépticamente.
- Mezclando durante aproximadamente 20 segundos en una mezcladora de vórtice. Asegurándose de invertir el tubo para que el NALC-NaOH entre en contacto con toda la superficie del tubo.
- Dejando que la mezcla repose a temperatura ambiente durante 15 minutos para descontaminar la muestra con un suave movimiento de la mano de vez en cuando
- Se diluyo la mezcla agregando tampón de fosfato estéril (pH 6,8) hasta la marca de 50 ml en el tubo y volver a tapar
- Centrifugando el tubo a 3000 g durante 15 min.
- Decantando el sobrenadante.

### **3.6.2.1 Preparación de Inóculo e Inoculación en Medio LJ**

- Se volvió a suspender el sedimento con 2 ml de tampón fosfato (pH 6.8)
- Se preparó una dilución 1:10 del sedimento resuspendido en tampón de fosfato 0.067 M para la inoculación de los tubos de control (se agrega 0,2 ml del sedimento resuspendido en 0.8 ml de tampón fosfato)
- Se inocularon 0.2 ml de la dilución 1:10 en cada tubo con medio LJ coagulados inclinados.
- Inmediatamente después de terminada la siembra y acondicionado el material se pasó a la autoclave, se trasladó la gradilla conteniendo los tubos sembrados hacia la(s) bandeja(s).
- Se tomó el primer tubo inoculado, distribuyendo la siembra en toda la superficie del medio sólido, aflojando ligeramente el cierre de la tapa para permitiendo intercambio de gases y la absorción de la siembra, ubicando el tubo en la bandeja inclinado.
- Procediendo de igual forma con cada tubo sembrado. Se rotuló cada bandeja con la fecha de inoculación de los tubos que contiene.

- Se traslado y ubico la bandeja a la estufa de incubación a 37 ° C. Verificando que los tubos quedaran con su pico de flauta hacia arriba, sin posibilidad de girar sobre sí mismos, y la siembra estuviera bien distribuida en toda su superficie.
- Se aseguró el orden de la estufa de incubación, ubicando las bandejas según su rotulo con la fecha para facilitar la inspección, seguimiento de los cultivos y registro de resultados. Verificando que las bandejas no sobresalgan de los estantes, que los tubos estén perfectamente contenidos en sus bandejas, y que el material incubado no se superponga, para evitar accidentes graves.

### **3.6.2.2 Extracción de ADN de Aislados Microbiológicos de *M. tuberculosis***

A partir de una muestra de colonias desarrolladas en los medios de cultivo Löwenstein-Jensen inoculados, se realizó la extracción de ADN genómico empleando la solución de lisis comercial *PrepMan Ultra (Applied Biosystems)* y lisis por ebullición durante 10 minutos, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

1. Utilizando 100 µl por muestra y una pipeta estéril, se transfirió la cantidad apropiada de *PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent* a un tubo cónico estéril de 50 ml u otro recipiente estéril.
2. Dispensando asépticamente 100 µl del *PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent* en el tubo con tapón de rosca apropiado para microcentrífuga.
3. Utilizando una colonia aislada, se seleccionó un pequeño cúmulo de células o en su caso el borde de una colonia de hongos filamentosos en una placa de cultivo. El tamaño ideal de la colonia es de 1-2 mm para bacterias y de 3 mm para hongos filamentosos.
4. Se suspendió las células en 100 µl de *PrepMan Ultra* en el tubo con tapón de rosca apropiado para microcentrífuga.
5. Se taparon adecuadamente los tubos y luego agitando vigorosamente la muestra durante 10 a 30 segundos.
6. Se colocaron los tubos con tapón de rosca apropiado para microcentrífuga en un bloque térmico a 95-100 °C durante 10 minutos.

7. Se retiraron los tubos del bloque térmico y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
8. Se centrifugo los tubos en una microcentrífuga a máxima velocidad durante 2 minutos.
9. Transfiriendo 50 µl del sobrenadante de los tubos a un segundo juego de tubos con tapón de rosca apropiado para microcentrífuga etiquetados y se desechó el sobrenadante restante. Usando 5 µl de sobrenadante por cada ensayo.
10. Se amplificó sus muestras utilizando el protocolo de ciclos térmicos apropiado.

### 3.6.2.3 Cuantificación de ADN

La cuantificación de los ADNs se llevó a cabo en un espectrofotómetro (nanodrop™ ND-2000 *Thermo Scientific*) según las indicaciones del equipo.

1. Levantando el brazo del equipo y se colocó el blanco de muestra a analizar, pipeteando un volumen de 1-1.5 µl de muestra.
2. Se cerró el brazo de toma de muestra y prosiguiendo con la medición (uso del software específico del equipo).
3. Cuando la lectura del blanco se completo, levantando el brazo del equipo y se secó con papel absorbente (kimwipes) el menisco.
4. Se repitieron los pasos del 1 al 3 para la medición de las muestras remanentes.

### 3.6.3 Diagnóstico Molecular Confirmatorio de *M. tuberculosis*

A partir del ADN aislado de cada uno de los cultivos se procedió a realizar la confirmación molecular de pertenencia al complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR en Tiempo Real Duplex con sondas TaqMan, de acuerdo al procedimiento descrito por *Broccolo en 2003*, en el que se amplifican simultáneamente un fragmento de la sección *senX3-regX3* para identificar una región común entre las micobacterias con el marcaje fluorescente VIC, y un fragmento de la región *IS6110* específico para las especies integrantes del complejo *Mycobacterium tuberculosis* con el marcaje fluorescente FAM.

Como cepa de referencia silvestre se empleó ADN de la cepa *H37Rv*, además de un control sintético tipo Gblock para cada gen analizado.

La reacción de PCR en Tiempo Real se realizó bajo condiciones de amplificación universales (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, por 50 ciclos) en el Termociclador 7500 Fast de Applied Biosystems, en un volumen de 20 µl, empleando el *MasterMix Quantitect Probe PCR Kit (QIAGEN)*.

Pruebas de susceptibilidad a los fármacos para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* por medio del ensayo de Microtitulación de resazurina (REMA) - Ensayo colorimétrico (Procedimiento para la placa REMA para medicamentos de primera y segunda línea)

### 3.6.3.1 Principio de la Prueba

Los métodos colorimétricos para detectar la resistencia a fármacos en *M. tuberculosis* se basan en la reducción de un indicador de oxidación-reducción añadido a un medio de cultivo líquido después de que *M. tuberculosis* ha sido expuesto *in vitro* a diferentes antibióticos. La resistencia se detecta por un cambio de color del indicador de oxidación-reducción, que es directamente proporcional al número de micobacterias viables en el medio.

**Tabla 8**

*Fármacos para la detección de MDR*

Fármacos	Nombre	Referencias	Conservación
INH	Isoniazida	Sigma I-3377 (5 g)	+4 °C
RPM	Rifampicina	Sigma R7382 (5 g)	-20 °C
SM	Estreptomina	Sigma D-5155 (25 g)	+4 °C
EMB	Etambutol	Sigma E-4630 (25 g)	+4 °C

### Preparación del caldo Middlebrook 7H9-S

7H9-Suplementado (7H9-S) = 7H9 caldo + 10 % OADC + 0.5 % glicerol + 0,1 % casitona

Para 200 ml de medio 7H9-S:

- Se pesaron 0.94 g de polvo 7H9 y disolver en 180 ml de agua destilada; mezclando hasta su completa solubilización.
- Se pesaron 0,2 g de casitona y añadiendo a la solución anterior hasta la solubilización completa. Se calentó la solución de ser necesario.
- Se autoclavo el caldo en un matraz de 250 ml
- Después del autoclavado y el enfriamiento, se añadió 20 ml de enriquecimiento de OADC (Ácido Oleico Dextrosa Catalasa) y 1 ml de glicerol estéril. Mezclando bien.
- Comprobando esterilidad en la incubadora (se dejó una noche en la incubadora y se comprobó al día siguiente si no había turbidez y si el medio seguía siendo transparente).
- Se almaceno el medio protegido de la luz directa a 4 °C.

### 3.6.3.2 Preparación del Inóculo

Fue muy importante tener un crecimiento fresco en un medio sólido (21-28 días de edad). Los cultivos más viejos pudieron dar lugar a resultados poco fiables en las pruebas de susceptibilidad.

Preparar una suspensión bacteriana de 1mg/ml como se indica a continuación:

- Se peso un vial estéril con perlas de vidrio (W1).
- Se tomo una asada completa de crecimiento bacteriano con un asa estéril y colocándolo en un vial estéril con perlas de cristal (tratando de no tomar ningún medio al retirar el crecimiento).
- Se volvió a pesar el vial estéril (W2).
- Se calculo el peso de las bacterias que hay en el vial:  $W3=W2-W1$
- Obteniendo una suspensión bacteriana de 1 mg/ml añadir una cantidad de agua destilada estéril igual a 1000 por peso bacteriano.

Ejemplo: añadiendo 3,7 ml de agua destilada si  $W3=3,7$  mg

- Vortexear la suspensión durante al menos 1 minuto

### 3.6.3.3 Inóculo de un Medio Líquido

- Se transfirió 2,5 ml del cultivo a un vial estéril que contuviera microesferas de vidrio.
- Se agito en el vórtice durante al menos 1 minuto hasta haber obtenido una suspensión bastante turbia.
- Se transfirió la suspensión a un tubo de plástico nuevo y dejándolo sedimentar durante 15 minutos.
- Comparando la turbidez de la suspensión con la de un tubo estándar McFarland 1.

### 3.6.3.4 Dilución del Inóculo

Se hizo una dilución 1:20 cuando se probaron medicamentos de primera línea y una dilución 1:10 para medicamentos de segunda línea con caldo 7H9-S. Si los medicamentos de primera y segunda línea se están probando juntos, hacer sólo una dilución 1:10 para ambos medicamentos.

**Tabla 9**

*Preparación de antibióticos*

Drogas/ Peso	Solvente/ Volumen	Stock ( $\mu\text{g/ml}$ )	Dilución de fármacos Existencias de medicamentos ( $\mu\text{l}$ )	7H9-S ( $\mu\text{l}$ )	Solución de trabajo (4X)	Gama ( $\mu\text{g/ml}$ )
INH/2 mg	Agua destilada/2 ml	1 000	10	2 490	4 $\mu$ g/ml	1 - 0.0312
RMP/20 mg	Metanol/2 ml	(I)10000 (II)1000	I(250) (II)20	2 250 2 480	8 $\mu\text{g/ml}$	2 - 0.0625
EMB/2 mg	Agua destilada/2 ml	1 000	160	2 340	64 $\mu\text{g/ml}$	16 - 0.5
SM/2 mg	Agua destilada/2 ml	1 000	40	2 460	16 $\mu\text{g/ml}$	4 - 0.125

- **Isoniazida (INH):** Se pesó 2 miligramos isoniazida en polvo y disolviendo en 2,0 ml de agua destilada, formando una solución madre de **1 mg/ml**. Se esterilizo por filtración con un filtro de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$ : conservando alícuotas congeladas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) hasta su utilización.
- **Rifampicina (RMP):** Se pesó 20 miligramos de rifampicina en polvo, disolviendo en 2,0 ml de metanol absoluto, formando una solución madre de **10 mg/ml**. Se esterilizo por filtración con un filtro de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$ ; conservando alícuotas congeladas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) hasta su utilización.
- **Etambutol (EMB):** Se pesó 2 miligramos de etambutol en polvo y disolviendo en 2,0 ml de metanol absoluto, formando una solución madre de **1 mg/ml**. Se esterilizo por filtración con un filtro de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$ ; conservando alícuotas congeladas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) hasta su utilización.
- **Estreptomicina (SM):** Se pesó 2 miligramos de estreptomicina en polvo y disolviendo en 2,0 ml de agua destilada, formando una solución madre de **1 mg/ml**. Se esterilizo por filtración con un filtro de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$ ; conservando alícuotas congeladas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) hasta su utilización.

Cada solución de trabajo de antibióticos se preparó a 4 veces la concentración final a analizar en la placa.

- **INH:** Añadió 10  $\mu\text{l}$  de solución madre (1 mg/ml) a 2490  $\mu\text{l}$  de caldo 7H9-S para obtener una solución INH de 4  $\mu\text{g/ml}$ .
- **RMP:** Haciendo dos diluciones: Se añadió 250  $\mu\text{l}$  de la solución madre (10 mg/ml) a 2250  $\mu\text{l}$  de 7H9-S y, a partir de esta concentración, añadiendo 20  $\mu\text{l}$  a 2480  $\mu\text{l}$  de caldo de 7H9-S obteniendo una solución RIF de 8  $\mu\text{g/ml}$ .
- **EMB:** Se añadieron 160  $\mu\text{l}$  de la solución madre (1 mg/ml) a 2340  $\mu\text{l}$  de caldo 7H9-S obteniendo una solución EMB de 64  $\mu\text{g/ml}$ .
- **SM:** Se añadieron 40  $\mu\text{l}$  de la solución madre (1 mg/ml) a 2460  $\mu\text{l}$  de caldo 7H9-S obteniendo una solución SM de 16  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.6.3.5 Preparación de la Placa REMA

Para medicamentos de primera línea: INH-RMP-EMB-SM

**Figura 16**

*Preparación de antibióticos*

A												
B	I 1µg/ml	R 2µg/ml	E 16µg/ml	S 4µg/ml	I 1µg/ml	R 2µg/ml	E 16µg/ml	S 4µg/ml	GC (+) strain A	GC (-) strain A		
C	↙ 0,5	↘ 1	↘ 8	↙ 2	↙ 0,5	↘ 1	↘ 8	↙ 2	GC (+) strain B	GC (-) strain B		
D	↙ 0,25	↘ 0,5	↘ 4	↙ 1	↙ 0,25	↘ 0,5	↘ 4	↙ 1				
E	↙ 0,125	↘ 0,25	↘ 2	↙ 0,5	↙ 0,125	↘ 0,25	↘ 2	↙ 0,5				
F	↙ 0,0625	↘ 0,125	↘ 1	↙ 0,25	↙ 0,0625	↘ 0,125	↘ 1	↙ 0,25				
G	↙ 0,0312	↘ 0,0625	↘ 0,5	↙ 0,125	↙ 0,0312	↘ 0,0625	↘ 0,5	↙ 0,125				
H												

Strain A
Strain B

Ver el

siguiente diagrama de microtitulación:

**Tabla 10***Preparación de antibióticos*

Solución madre	Solución de trabajo	Dilución en 7H9-S	Concentración final
INH 1 mg/ml	4 g/ml	> 10 l stock + 2490 l 7H9-S	1 g/ml
RMP 10 mg/ml	8 g/ml	> 250 l stock + 2250 l 7H9-S (i) > 20 l en 2480 l 7H9-S (ii)	2 g/ml
EMB 1mg/ml	64 g/ml	> 160 l stock + 2340 l 7H9-S	16 g/ml
SM 1mg/ml	16 g/ml	> 40 l stock + 2460 l 7H9-S	4 g/ml

**Incubación:** 37 °C, 7 días

En una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos había suficiente espacio para probar dos aislados contra los cuatro medicamentos en seis diluciones dobles de cada medicamento.

- Se añadieron 100 µl de caldo 7H9-S a las columnas 2-11 de las filas B a G
  - Se añadieron 100 µl de la solución de trabajo de INH al pocillo B2 y B6
  - Se añadieron 100 µl de la solución de trabajo de RMP al pocillo B3 y B7
  - Se añadieron 100 µl de la solución de trabajo de EMB al pocillo B4 y B8
  - Se añadieron 100 µl de la solución de trabajo de SM al pocillo B5 y B9
- Con una pipeta multicanal se hicieron diluciones de las filas B a G (columnas 2-5 y 6-9) desechando los últimos 100 µl después de mezclar en la fila G.
  - Añadiendo 100 µl de caldo 7H9-S a los pocillos B11 y C11; éstos representaron los controles negativos y de esterilidad de la prueba.
  - Se añadieron 200 µl de agua destilada estéril a todos los pocillos exteriores sin caldo; esto evito la evaporación durante la incubación de la placa.

### 3.6.3.6 Inoculación de las Placas

Utilizando puntas con filtros, se inocularon las placas con 100  $\mu$ l de la cepa A (o cepa B) (dilución 1:20 o 1:10) en todos los pocillos con CG (+), pero no en el pocillo que contenía el control negativo. Después de la inoculación, se sellaron las placas en bolsas de plástico e incubaron a 37°C durante 7 días.

### 3.6.3.7 Preparación de la Solución de Resazurina

Se preparo una solución de resazurina al 0,01% o 0,02% en agua destilada, esterilizada por filtración a 0.2  $\mu$ m y se mantuvo a 4°C durante 1-2 semanas y protegida de la luz.

### 3.6.3.8 Desarrollo del Color e Interpretación de los Resultados

Después de 7 días de incubación, se tomaron las placas de la incubadora y se añadió 30  $\mu$ l de resazurina al 0,01% o 0,02% a todos los pocillos y la placa se selló de nuevo y se incubo durante la noche para desarrollar el color.

Un cambio en el color de azul a rosa significaba crecimiento del aislado en esa concentración de la droga. Para una mejor interpretación de los resultados, el color debió ser comparado con el color presente en el pozo control de crecimiento.

- **La concentración mínima inhibitoria (CMI)** de cada medicamento se interpreto como la concentración más baja del antibiótico que impide un cambio en el color de la resazurina. Los valores de CMI se clasifican para cada aislado para su comparación con los resultados obtenidos con el método de proporción.
- **Controles positivos y negativos:** El control positivo mostro un crecimiento positivo y el control negativo no mostro ningún crecimiento durante el período del protocolo de incubación. Si el control negativo hubiera mostrado un crecimiento, se investiga los procedimientos, pudiendo ser manipulación cruzada y comprobando si todos los reactivos son una posible fuente de contaminación.

**Tabla 11***Concentración de interrupción*

Drogas	CMI REMA	Interpretación
INH	0.25 µg/ml	≥ 0.25 = resistente
RMP	0.5 µg/ml	≥ 0.5 = resistente
EMB	4.0 µg/ml	≥ 4.0 = resistente
SM	1.0 µg/ml	≥ 1.0 = resistente

### 3.6.3.9 Amplificación de la región HotSpot del gen *rpoB*

La amplificación del gen diana fue llevado a cabo en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystems), de acuerdo a las condiciones descritas a continuación.

**Tabla 12***Condiciones para la amplificación del gen diana*

Primer	Secuencia	Producto	Referencia
<b>Seq-<i>rpoB</i>-F</b>	CCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACAC	320 pb	Parsons, L <i>et al.</i>
<b>Seq-<i>rpoB</i>-R</b>	CGTTTCGATGAACCCGAACGGGTTGAC		2005

**Tabla 13***Condiciones de reacción:*

Reacción	[ ] Trabajo	1X
Agua	-----	10.54 µl
Gotaq flexi Green 5x	1x	4 µl
MgCl <sub>2</sub> 1mM	1 mM	0.8 µl
dNTP'S 10 mM	0.2 mM	0.4 µl
Primers ( <i>rpoB</i> mix: F,R) 5 µM	5 µM	2.5 µl
Gotaq flexi DNA polymerase 5 U/µl	0.065 U/µl	0.26 µl
DNA		1.5 µl
Volumen final		20 µl

**Tabla 14**

Condiciones del termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystems):

Temperatura	Tiempo	
94 °C	5 minutos	
94 °C	20 segundos	35 ciclos
57 °C	20 segundos	
72 °C	23 segundos	
72 °C	5 minutos	

### 3.6.3.10 Amplificación de las regiones HotSpot de los genes *katG*, *inhA* y *rrs*

La amplificación de un fragmento del gen diana se realizó en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystems), de acuerdo a las condiciones descritas a continuación:

**Tabla 15**

Amplificación de las regiones HotSpot de los genes *KatG*, *inhA* y *rrs*

Primer	Secuencia	Tamaño del producto	Referencias
Seq- <i>katG</i> -F(Tb86)	GAAACAGCGGCGCTGATCGT	209 pb	Parsons, L <i>et al.</i> 2005.
Seq- <i>katG</i> -R(Tb87)	GTTGTCCCATTTCGTCGGGG		
Seq- <i>inhA</i> -F( <i>inhAP3</i> )	CGCAGCCAGGGCCTCGCTG	246 pb	Chaoui, I <i>et al.</i> 2009.
Seq- <i>inhA</i> -R( <i>inhAP5</i> )	CTCCGGTAACCAGGACTGA		
Seq- <i>rrs</i> F1	GTCAGGATATTTCTAAATACCTTTGG	805 pb	Ramaswamy, SV. <i>et al.</i> , 2004.
Seq- <i>rrs</i> R1	CACCTCAGCGTCAGTTACTG		
Seq- <i>rrs</i> F2	CAGTAACTGACGCTGAGGAG	821 pb	
Seq- <i>rrs</i> R2	GTTTTTCGTGGTGCTCCTTAG		

**Tabla 16***Condiciones de reacción:*

Reacción	<i>katG</i>		<i>inhA</i>	
	[ ] Trabajo	1X	[ ] trabajo	1X
Agua		10.54 µl		10.38 µl
Gotaq flexi Green 5x	1x	4 µl	1x	4 µl
MgCl 1Mm	1 mM	0.8 µl	1.2 mM	0.96 µl
dNTP'S 10 Mm	0.2 mM	0.4 µl	0.2 Mm	0.4 µl
Primers (mix: F,R) 5 µM	5 µM	2.5 µl	5 µM	2.5 µl
Gotaq flexi DNA polymerase 5 U/µl	0.065 U/µl	0.26 µl	0.065 U/ µl	0.26 µl
DNA		1.5 µl		1.5 µl
Volumen final		20 µl		20 µl

**Tabla 17***Condiciones del termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystems)*

<i>KatG</i>		<i>inhA</i>	
Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo
94 C	5 minutos	94 C	5 minutos
94 C	20 segundos	94 C	15 segundos
57 C	20 segundos	57 C	15 segundos
72 C	23 segundos	72 C	18 segundos
72 C	5 minutos	72 C	2 minutos

### 3.6.3.11 Amplificación de los Amplicones

Se realizó una dilución 1:20 de cada uno de los amplicones *katG* e *inhA* obtenidos y posteriormente se sometió nuevamente a PCR estándar con oligos específicos con adaptadores M13 en la región 5' a los primers:

**Tabla 18***Dilución 1:20 Amplificación de los amplicones*

Primer	Secuencia Primer	Producto
Seq-M13 <i>katG</i> - F(Tb86)	TGAAAACGACGGCCAGTGAAACAGCGGCGCTGATCGT	227 pb
Seq-M13 <i>katG</i> - R (Tb87)	CAGGAAACAGCTATGACCGTTGTCCCATTTTCGTCGGGG	
Seq-M13 <i>inhA</i> - F (inhAP3)	TGAAAACGACGGCCAGTCGCAGCCAGGGCCTCGCTG	264 pb
Seq-M13 <i>inhA</i> - R (inhAP5)	CAGGAAACAGCTATGACCCTCCGGTAACCAGGACTGA	
Seq- <i>rpoB</i> -F	TGAAAACGACGGCCAGTCCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACAC	356 pb
Seq- <i>rpoB</i> -R	CAGGAAACAGCTATGACCCGTTTCGATGAACCCGAACGGGTTGAC	
Seq-M13 rrs F1	TGAAAACGACGGCCAGTGTCAGGATATTTCTAAATACCTTTGG	841 pb
Seq-M13 rrs R1	CAGGAAACAGCTATGACCCACCTCAGCGTCAGTTACTG	
Seq-M13 rrs F2	TGAAAACGACGGCCAGTCAGTAACTGACGCTGAGGAG	857 pb
Seq-M13 rrs R2	CAGGAAACAGCTATGACCGTTTTTCGTGGTGCTCCTTAG	
F-M13	TGAAAACGACGGCCAGT	
R-M13	CAGGAAACAGCTATGACC	

**Tabla 19**

*Condiciones de reacción para ambas regiones en katG te inhA:*

Reacción	[ ] Trabajo	1X
Agua	-----	10.54 µl
Gotaq flexi Green 5x	1x	4 µl
MgCl <sub>2</sub> 1mM	1 mM	0.8 µl
dNTP'S 10 mM	0.2 mM	0.4 µl
Primers (adaptadores M13)* 5 µM	5 µM	2.5 µl
Gotaq flexi DNA polymerase 5 U/µl	0.065 U/µl	0.26 µl
DNA		1.5 µl
Volumen final		20 µl

\*Se emplearon adaptadores M13 para cada gen respectivamente

**Tabla 20**

*Condiciones del termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystems)*

Temperatura	Tiempo	
94 °C	5 minutos	
94 °C	20 segundos	35 ciclos
57 °C	20 segundos	
72 °C	23 segundos	
72 °C	5 minutos	

### **3.6.3.12 Purificación de los amplicones obtenidos mediante el kit PureLink PCR Purification**

- 1. Combinar.** Se añadieron 4 volúmenes del Buffer de unión B2 o B3 con isopropanol (ver cuadro anterior) a 1 volumen de una muestra de ADN (50-100 µl). Mezclando bien.
- 2. Cargar.** Se colocó la muestra en una columna giratoria PureLink y a su vez insertada en un tubo de recolección. Centrifugando la columna a >10,000 g durante 1 minuto. Se desecha el filtrado.

3. **Lavar.** Se vuelve a insertar la columna en el tubo de recolección y añadiendo 600 µl del buffer de lavado (W1) con etanol. Se centrifugo la columna a >10,000 g durante 1 minuto. Descartando el filtrado y colocando la columna en el mismo tubo de recolección. Se centrifugo la columna a velocidad máxima por 2-3 minutos.
4. **Eluir.** Se colocó la columna en un tubo nuevo de elución de 1.7 ml. Se agregó 50 µl del buffer de elución en el centro de la columna. Incubando la columna a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugo la columna a velocidad máxima por 2 minutos. El tubo de elución contiene el producto de PCR purificado. Almacenando el ADN purificado a 4 °C para uso inmediato o a -20 °C para almacenamiento a largo plazo.

### **3.6.3.13 Electroforesis de Amplicones**

1. Se agrego buffer TAE 0.5X a la cámara de electroforesis.
2. Se preparo el gel de agarosa al porcentaje adecuado (1.7%), agregando 0.51 gr de agarosa en 30 ml de TAE 0.5X, caliente en el microondas de 1-2 minutos. Enfríe y vacíe al molde evitando burbujas.
3. Coloque el gel en la cámara de electroforesis orientando los pozos hacia el polo negativo.
4. Coloque una muestra por pozo disuelta en buffer de carga 6X.
5. Coloque un marcador de peso molecular en el primer pozo (marcador de 100 pb).
6. Encendí la cámara y aplique un campo eléctrico de 80 V; deje migrar a la distancia deseada y apague la cámara.
7. Teñí el gel en una solución de GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10,000X a una concentración de 1 µl/20 ml, por 2 minutos para hacer visible el corrimiento de los amplicones obtenidos.
8. Visualicé las bandas con luz UV en un fotodocumentador.

### **3.6.3.14 Marcaje y Secuenciación**

A partir de los amplicones obtenidos, se realizó la purificación con el kit ExoSAP-IT™ (5 µl de producto amplificado y 2 µl de la enzima ExoSAP-IT™), bajo las siguientes condiciones de reacción:

**Tabla 21***Condiciones de reacción*

Proceso	Temperatura	Tiempo
Digestión enzimática	37 °C	30 minutos
Desnaturalización	80 °C	15 minutos

El producto de la reacción enzimática se separó en dos microtubos: 3.5 µl a cada tubo, los cuales se trabajaron de manera independiente para el proceso de marcaje fluorescente con el estuche BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, con las condiciones de reacción que se describen a continuación:

**Tabla 22***Condiciones de reacción*

Reactivos	Volumen (µl)	[ ] Final
BigDye™ Terminator 3.1 Reaction Mix 1	1	-
BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	2	1X
Iniciador M13 Fod y Rev, 3.2 pMol	1	3.2 pMol
Producto enzimático	3.5	-
H <sub>2</sub> O grado biología molecular	2.5	-
Total	10 µl	

**Tabla 23**

*El programa para el marcaje se describe a continuación:*

Proceso	Temperatura	Tiempo
Paso I		
Activación enzimática	95 °C	2 minutos
Paso II		
Desnaturalización	95 °C	5 segundos
Alineamiento	30 °C	20 segundos
Extensión	60 °C	2 min
Numero de ciclos	30	-----

Los productos finales se almacenaron a 4 °C hasta el siguiente proceso. Después del proceso de marcaje se centrifugo la placa de reacción por 1 min a 14,000 rpm. A cada tubo se agregaron el volumen de 35 µl de solución Mix Xterminator (SAM 28.5 µL y 6.5 µL de XTerminator). Se mezclaron en un vórtex a 1800 rpm por 50 min. Se le dio un spin a los tubos a 1,000 g por 2 min. Posteriormente se transfirieron a la placa de reacción, y finalmente al analizador genético ABI Prism 3130.

Los resultados fueron visualizados en el software FinchTV, y analizados y curados para la obtención de contigs en el software CodonCode Aligner Versión 8.0.2. Las secuencias se exportaron en formato FASTA y alineados mediante el algoritmo Clustal Omega en la página web de la EMBL. A partir del alineamiento se identificaron las mutaciones en las muestras analizadas.

## Resultados

### 4.1 Cultivos en Medio Löwenstein-Jensen

Entre septiembre de 2023 y febrero de 2024, se examinaron 14 muestras de nuevos casos de tuberculosis pulmonar de pacientes que asistieron a la Clínica de Tuberculosis del HRAE "Ciudad Salud". Estas muestras fueron cultivadas utilizando el medio Löwenstein-Jensen. En la figura 2 se muestra uno de los cultivos de las muestras analizadas. Sin embargo, cinco de los cultivos fueron desechados debido a la contaminación por hongos, dejando nueve para un análisis posterior. Se observó que la mayoría de los cultivos mostraron crecimiento después de 19 días de incubación.

#### Figura 17

*Cultivo de Mycobacterium tuberculosis en medio Löwenstein-Jensen.*



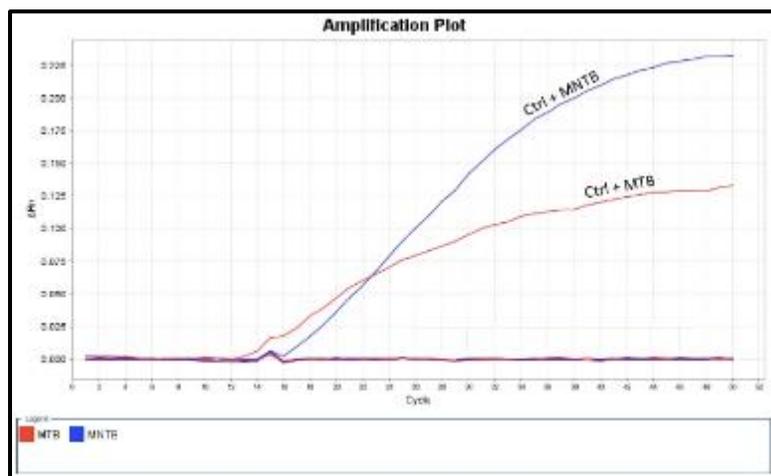
Nota. Se presenta un cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* representativo obtenido de las muestras analizadas después de 4 semanas de incubación.

## 4.2 Confirmación Molecular de Pertenencia al Complejo Tuberculosis Mediante qPCR

Los 9 aislados microbiológicos de *Mycobacterium* fueron confirmados como pertenecientes al complejo tuberculosis por el procedimiento descrito por Broccolo en 2003 (Figura 18).

**Figura 18**

*Diagnóstico molecular por qPCR de Mycobacterium tuberculosis.*



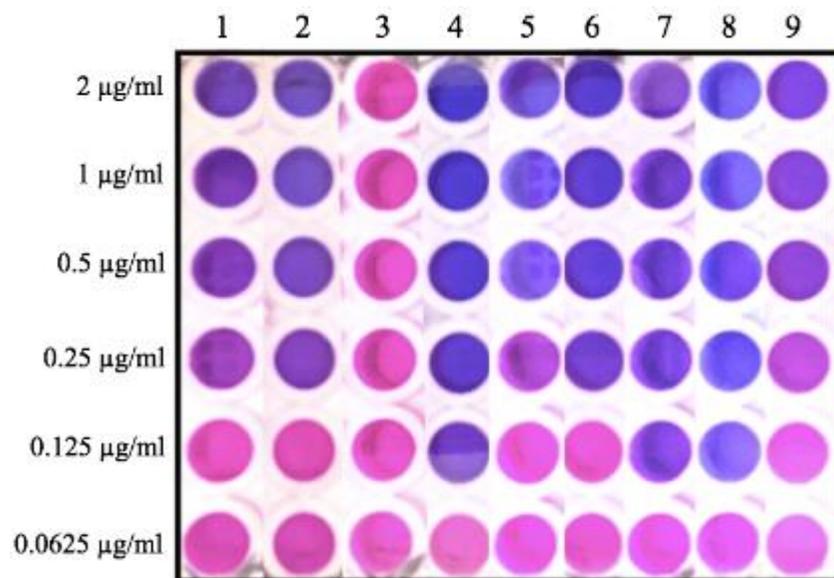
Nota. Se muestra el resultado de PCR en Tiempo Real por el método descrito por Broccolo en 2003, observándose los controles positivos y negativos que nos permiten la identificación positiva de componentes del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

### 4.2.1 Prueba de susceptibilidad fenotípica in vitro a RMP, INH, EST, KAN, AMI y CAP de los aislados clínicos por medio del ensayo de microtitulación de resazurina (REMA)

La muestra 3 fue la única que mostró resistencia in vitro a los cultivos con Rifampicina. En cuanto a las ocho muestras restantes, todas demostraron sensibilidad al antibiótico RMP, aunque con diferentes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Las muestras 4, 7 y 8 tuvieron una CMI de 0.125  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que las muestras 1, 2 y 6 mostraron una CMI de 0.25  $\mu\text{g/ml}$ . Por último, las muestras 5 y 9 presentaron una CMI de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , como se muestra en la Figura 19.

**Figura 19**

*Prueba de susceptibilidad a RMP de los aislados de M. tuberculosis.*

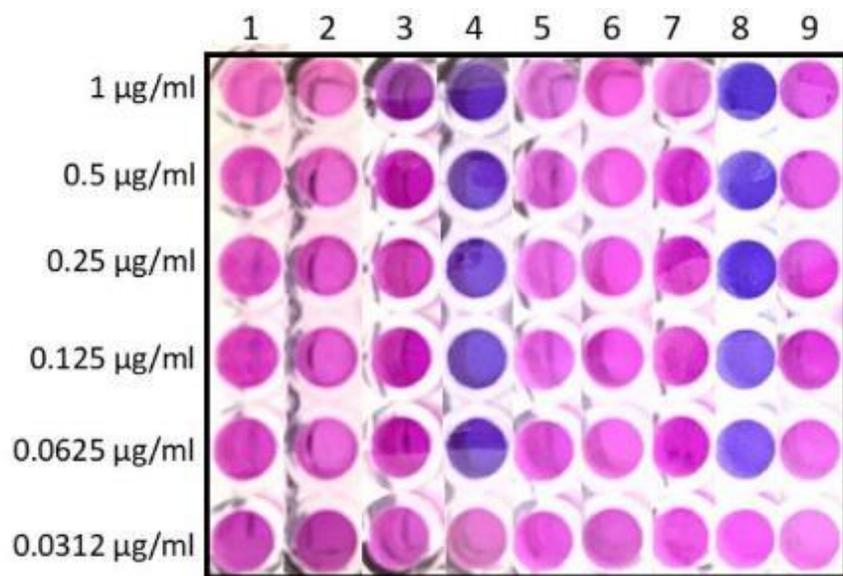


Nota: se observa que solamente la muestra 3 presenta resistencia a RMP.

Solo los aislados de las muestras 4 y 8 muestran sensibilidad in vitro a los cultivos con Isoniazida, con una Concentración Mínima Inhibitoria de 0,0625 µg/ml para ambas muestras, según se muestra en la figura 5. En contraste, las siete muestras restantes muestran resistencia a INH.

**Figura 20**

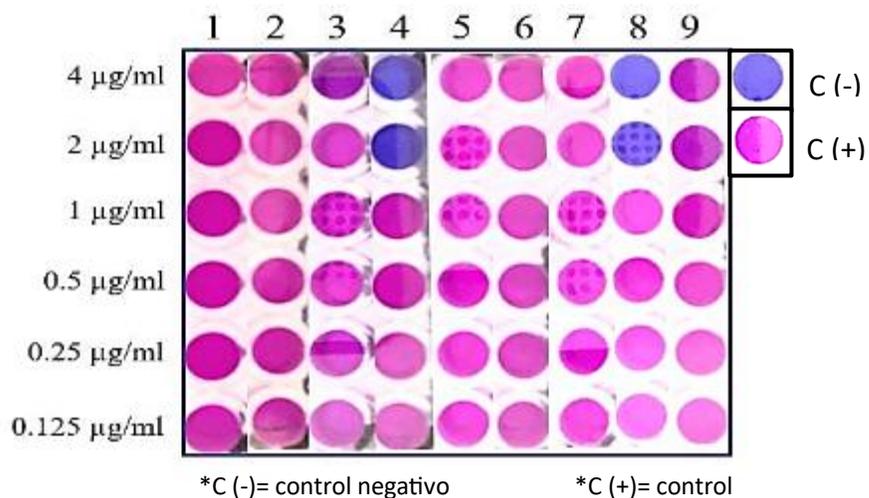
*Resultados de las pruebas de susceptibilidad por medio del ensayo REMA a INH de los aislados de MTB*



Nota. Las muestras 4 y 7 presentan sensibilidad a INH con una CMI de 0.0625 µg/ml.

**Figura 21**

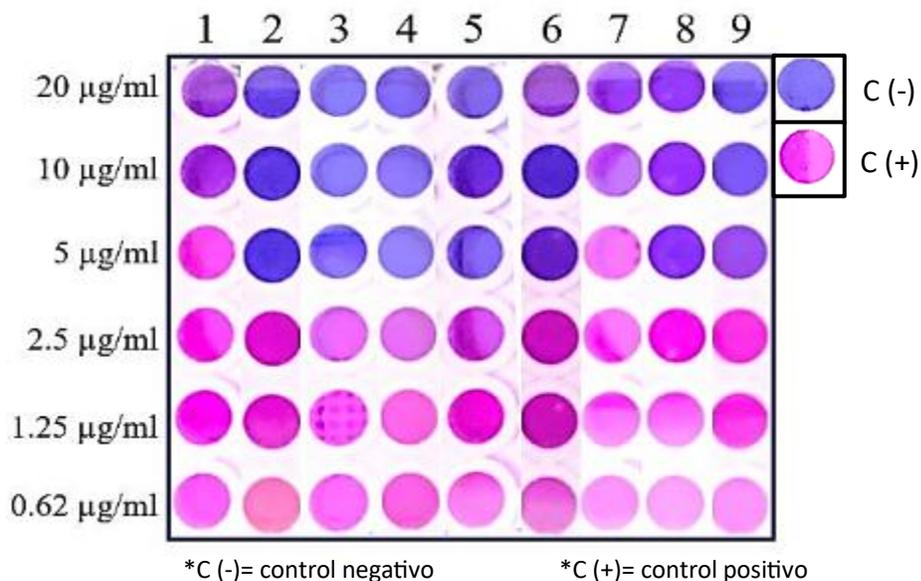
*Prueba de susceptibilidad a Estreptomicina de los aislados clínicos de M. tuberculosis*



Nota. De los 9 aislados clínicos, 7 muestras presentaron resistencia a Estreptomicina, esto equivale a que un 77.7% de las muestras son resistentes. Solo las muestras 4 y 8 presentaron una CMI de 2µg/ml.

**Figura 22**

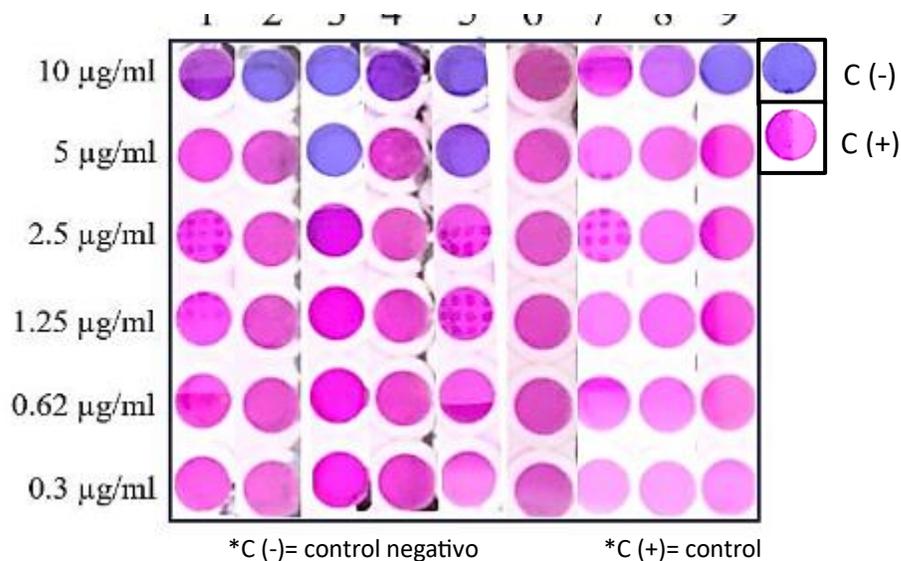
*Prueba de susceptibilidad a Kanamicina/Amikacina.*



Nota. De los 9 aislados clínicos, todos son medianamente sensibles a Kanamicina (ya que kanamicina y amikacina han demostrado una eficacia muy similar, los resultados de kanamicina se pueden extrapolar para amikacina) la CMI para 7 de las muestras es de 5 µg/ml excepto para las muestras 1 y 7 que tienen una CMI de 10 µg/ml.

**Figura 23**

*Prueba de susceptibilidad a Capreomicina.*

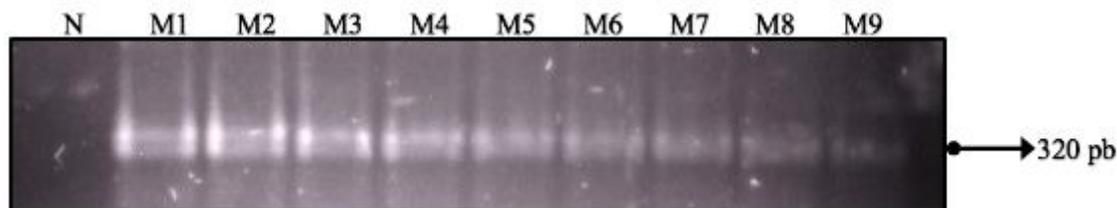


Nota. De los 9 aislados clínicos, 3 muestras (6, 7 y 8) presentaron resistencia a Capreomicina, esto equivale a que un 33.3% de las muestras son resistentes. El resto presentaron una sensibilidad muy baja al tener una CMI 10 µg/ml.

#### **Amplificación de la región HotSpot del gen *rpoB***

**Figura 24**

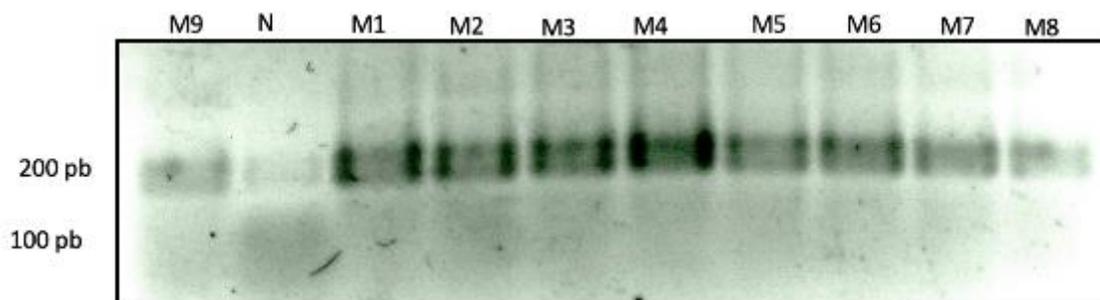
*Amplicones del gen *rpoB**



Nota. Confirmación de amplificación positiva en gel de agarosa al 1.7% de cada una de las muestras, iniciando con el control negativo en el carril 1 y los subsecuentes productos con un peso de 320 pb.

**Figura 25**

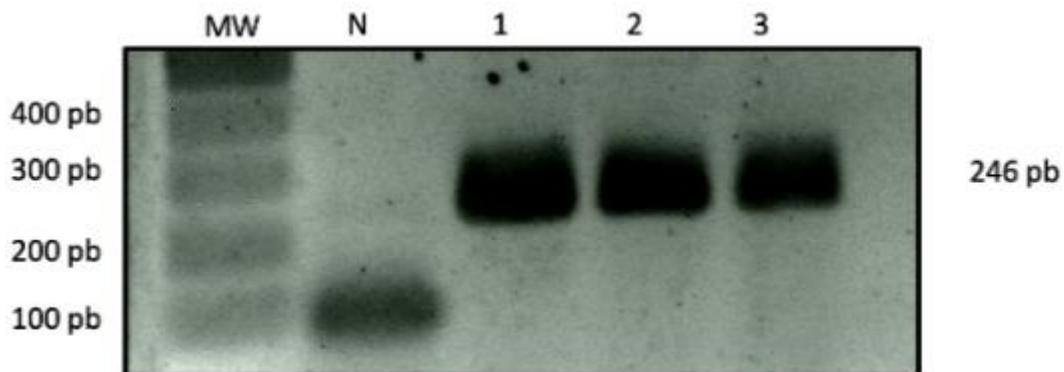
*Amplicones del gen katG.*



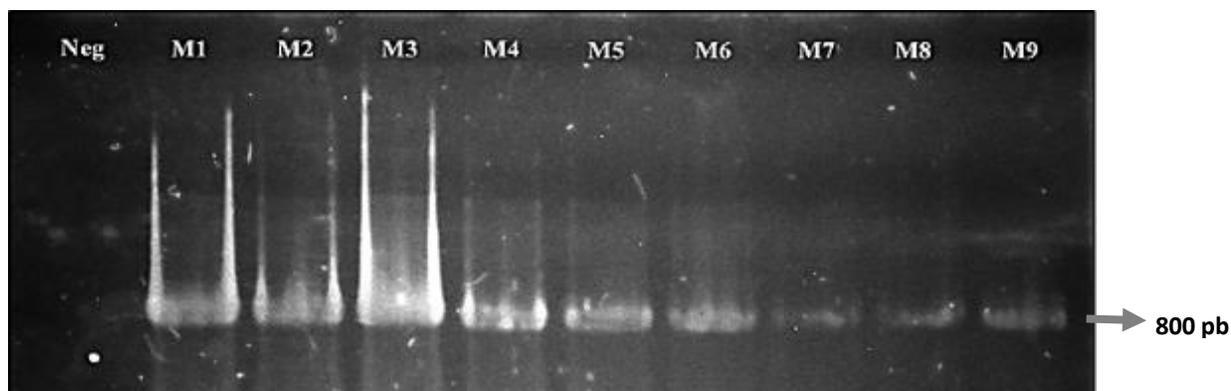
Nota. N: Negativo. Las bandas obtenidas de 209pb corresponden a cada uno de los aislados. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7%.

**Figura 26**

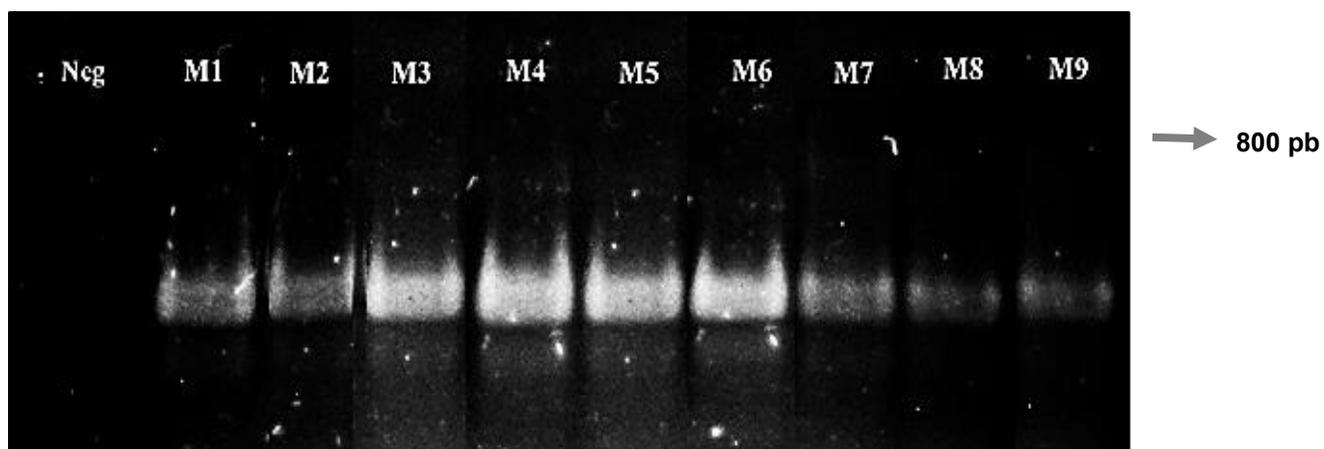
*Amplicones del gen inhA*



Nota. MW: Marcador de peso molecular de 100pb Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder; N: negativo. Las bandas obtenidas de 246pb corresponden a cada uno de los aislados. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7%.

**Figura 27***Amplicones del gen rrs parte 1*

Nota. Confirmación de amplificación positiva en gel de agarosa al 1.7% de cada una de las 9 muestras. Carril 1 limpio con control negativo (Neg), carriles 2 al 10 con los amplicones, todos con un peso aproximado de 800 pb.

**Figura 28***Amplicones del gen rrs parte 2*

Nota. Confirmación de amplificación positiva en gel de agarosa al 1.7% de cada una de las 9 muestras. Iniciando con el control negativo (Neg) en el carril 1 y carriles del 2 al 10 con los amplicones, todos con un peso aproximado de 800 pb.

## Secuenciación de amplicones de la región HotSpot del gen *rpoB*

Alienamiento de secuencias del gen *rpoB* de los aislados microbiológicos de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el software Clustal Omega (versión 1.2.4) multiple sequence CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

rpoB-ref	CGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCA	60
rpoB-M1	CGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCA	60
rpoB-M2	CGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCA	60
rpoB-M4	CGCAGACGTTGATCaACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCA	60
rpoB-M5	CGCAGACGTTGATCaACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCA	60
rpoB-M6	CGCAGACGTTGATCAaCATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCA	60
rpoB-M7	CGCAGACGTTGATCaACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCA	60
rpoB-M8	CGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCA	60
rpoB-M9	CGCAGACGTTGATCAACaTCCGGCCGGTGGTCGCCGCGaTCAAGGAGTTCTTCGGCACCA	60
rpoB-M3	CGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTC <b>GGCACCA</b>	60
	*****	
rpoB-ref	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTTCGGGGTTGACCCACAAGCGCC	120
rpoB-M1	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTTCGGGGTTGACCCACAAGCGCC	120
rpoB-M2	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTTCGGGGTTGACCCACAAGCGCC	120
rpoB-M4	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTTCGGGGTTGACCCACAAGCGCC	120
rpoB-M5	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTTCGGGGTTGACCCACAAGCGCC	120
rpoB-M6	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTTCGGGGTTGACCCACAAGCGCC	120
rpoB-M7	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTTCGGGGTTGACCCACAAGCGCC	120
rpoB-M8	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTTCGGGGTTGACCCACAAGCGCC	120
rpoB-M9	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTTCGGGGTTGACCCACAAGCGCC	120
rpoB-M3	<b>GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTTCGGGGTTGACCTACAAGCGCC</b>	120
	*****	
rpoB-ref	GACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCG	180
rpoB-M1	GACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCG	180
rpoB-M2	GACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCG	180
rpoB-M4	GACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCG	180
rpoB-M5	GACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCG	180
rpoB-M6	GACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCG	180
rpoB-M7	GACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCG	180
rpoB-M8	GACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCG	180
rpoB-M9	GACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCG	180
rpoB-M3	<b>GACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCG</b>	180
	*****	
rpoB-ref	ACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACA	240
rpoB-M1	ACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACA	240

rpoB-M2	ACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACA	240
rpoB-M4	ACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACA	240
rpoB-M5	ACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACA	240
rpoB-M6	ACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACA	240
rpoB-M7	ACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACA	240
rpoB-M8	ACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACA	240
rpoB-M9	ACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACA	240
rpoB-M3	ACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACA	240
	*****	
rpoB-ref	TCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGG	275
rpoB-M1	TCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGG	275
rpoB-M2	TCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGG	275
rpoB-M4	TCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGG	275
rpoB-M5	TCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGG	275
rpoB-M6	TCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGG	275
rpoB-M7	TCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGG	275
rpoB-M8	TCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGG	275
rpoB-M9	TCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGG	275
rpoB-M3	TCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGG	275
	*****	

El análisis de la secuencia HotSpot del gen *rpoB*, que abarca una región resaltada de 81 pares de bases que incluye desde el codón 507 hasta el 533, revela que únicamente la muestra 3 muestra una mutación en el codón 526, indicada por el nucleótido resaltado en rojo.

Alineamiento de secuencias del gen *katG* e *inhA* de los aislados microbiológicos de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el software Clustal Omega (versión 1.2.4) multiple sequence

### *inhA*

inhA-ref	CCCAGAAAGGGATCCGTCATGGTCTGAAGTGTGCTGAGTCACACCGACAAACGTCACGAGC	60
inhA-M1	CCCAGAAAGGGATCCGTCATGGTCTGAAGTGTGCTGAGTCACACCGACAAACGTCACGAGC	60
inhA-M2	CCCAGAAAGGGATCCGTCATGGTCTGAAGTGTGCTGAGTCACACCGACAAACGTCACGAGC	60
inhA-M3	CCCAGAAAGGGATCCGTCATGGTCTGAAGTGTGCTGAGTCACACCGACAAACGTCACGAGC	60
inhA-M4	CCCAGAAAGGGATCCGTCATGGTCTGAAGTGTGCTGAGTCACACCGACAAACGTCACGAGC	60
inhA-M5	CCCAGAAAGGGATCCGTCATGGTCTGAAGTGTGCTGAGTCACACCGACAAACGTCACGAGC	60
inhA-M6	CCCAGAAAGGGATCCGTCATGGTCTGAAGTGTGCTGAGTCACACCGACAAACGTCACGAGC	60
inhA-M7	CCCAGAAAGGGATCCGTCATGGTCTGAAGTGTGCTGAGTCACACCGACAAACGTCACGAGC	60
inhA-M8	CCCAGAAAGGGATCCGTCATGGTCTGAAGTGTGCTGAGTCACACCGACAAACGTCACGAGC	60

inhA-M9	CCCAGAAAGGGATCCGTCATGGTCTGAAGTGTGCTGAGTCACACCGACAAACGTCACGAGC *****	60
inhA-ref	GTAACCCCAGTGCGAAAGTTCCCGCCGAAATCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC	120
inhA-M1	GTAACCCCAGTGCGAAAGTTCCCGCCGAAATCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC	120
inhA-M2	GTAACCCCAGTGCGAAAGTTCCCGCCGAAATCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC	120
inhA-M3	GTAACCCCAGTGCGAAAGTTCCCGCCGAAATCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC	120
inhA-M4	GTAACCCCAGTGCGAAAGTTCCCGCCGAAATCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC	120
inhA-M5	GTAACCCCAGTGCGAAAGTTCCCGCCGAAATCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC	120
inhA-M6	GTAACCCCAGTGCGAAAGTTCCCGCCGAAATCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC	120
inhA-M7	GTAACCCCAGTGCGAAAGTTCCCGCCGAAATCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC	120
inhA-M8	GTAACCCCAGTGCGAAAGTTCCCGCCGAAATCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC	120
inhA-M9	GTAACCCCAGTGCGAAAGTTCCCGCCGAAATCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC *****	120
inhA-ref	CGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCTGGGGTGACTGCCACAGCCACTGA	180
inhA-M1	CGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCTGGGGTGACTGCCACAGCCACTGA	180
inhA-M2	CGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCTGGGGTGACTGCCACAGCCACTGA	180
inhA-M3	CGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCTGGGGTGACTGCCACAGCCACTGA	180
inhA-M4	CGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCTGGGGTGACTGCCACAGCCACTGA	180
inhA-M5	CGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCTGGGGTGACTGCCACAGCCACTGA	180
inhA-M6	CGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCTGGGGTGACTGCCACAGCCACTGA	180
inhA-M7	CGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCTGGGGTGACTGCCACAGCCACTGA	180
inhA-M8	CGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCTGGGGTGACTGCCACAGCCACTGA	180
inhA-M9	CGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCTGGGGTGACTGCCACAGCCACTGA *****	180
inhA-ref	AGGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGT	208
inhA-M1	AGGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGT	208
inhA-M2	AGGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGT	208
inhA-M3	AGGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGT	208
inhA-M4	AGGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGT	208
inhA-M5	AGGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGT	208
inhA-M6	AGGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGT	208
inhA-M7	AGGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGT	208
inhA-M8	AGGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGT	208
inhA-M9	AGGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGT *****	208

En el gen *inhA* no se identificó ninguna mutación.

***katG***

katG-Ref	ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACA	60
katG-M1	ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACA	60
katG-M2	ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACA	60
katG-M4	ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACA	60
katG-M5	ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACA	60
katG-M6	ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACA	60
katG-M7	ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACA	60
katG-M8	ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACA	60
katG-M9	ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACA	60
katG-M3	ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCACCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACA	60
	*****	
katG-Ref	TGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT	120
katG-M1	TGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT	120
katG-M2	TGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT	120
katG-M4	TGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT	120
katG-M5	TGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT	120
katG-M6	TGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT	120
katG-M7	TGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT	120
katG-M8	TGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT	120
katG-M9	TGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT	120
katG-M3	TGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT	120
	*****	
katG-Ref	CGGCGGTCACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGG	170
katG-M1	CGGCGGTCACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGG	170
katG-M2	CGGCGGTCACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGG	170
katG-M4	CGGCGGTCACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGG	170
katG-M5	CGGCGGTCACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGG	170
katG-M6	CGGCGGTCACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGG	170
katG-M7	CGGCGGTCACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGG	170
katG-M8	CGGCGGTCACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGG	170
katG-M9	CGGCGGTCACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGG	170
katG-M3	CGGCGGTCACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGG	170
	*****	

El análisis de la secuencia HotSpot del gen *katG* indica que solamente la muestra 3 (nucleótido en color rojo) presenta mutación.

**rrs**

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

1

+

```

RRS-REF/1-1562 CTCCCTTTTCCAAAGGGAGTGTGGGTTTGTGGAGAGTTGATCCTGGCTCAGGAC
RRS-M1/1-795   CTCCCTTTTCCAAAGGGAGTGTGGGTTTGTGGAGAGTTGATCCTGGCTCAGGAC
RRS-M2/1-1200 CTCCCTTTTCCAAAGGGAGTGTGGGTTTGTGGAGAGTTGATCCTGGCTCAGGAC
RRS-M3/1-1500 CTCCCTTTTCCAAAGGGAGTGTGGGTTTGTGGAGAGTTGATCCTGGCTCAGGAC
RRS-M4/1-777   CTCCCTTTTCCAAAGGGAGTGTGGGTTTGTGGAGAGTTGATCCTGGCTCAGGAC
RRS-M5/1-1216 CTCCCTTTTCCAAAGGGAGTGTGGGTTTGTGGAGAGTTGATCCTGGCTCAGGAC
RRS-M6/1-1190 CTCCCTTTTCCAAAGGGAGTGTGGGTTTGTGGAGAGTTGATCCTGGCTCAGGAC
RRS-M7/1-1188 CTCCCTTTTCCAAAGGGAGTGTGGGTTTGTGGAGAGTTGATCCTGGCTCAGGAC
RRS-M8/1-1490 CTCCCTTTTCCAAAGGGAGTGTGGGTTTGTGGAGAGTTGATCCTGGCTCAGGAC
RRS-M9/1-1203 CTCCCTTTTCCAAAGGGAGTGTGGGTTTGTGGAGAGTTGATCCTGGCTCAGGAC

RRS-REF/1-1562 GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACT
RRS-M1/1-795   GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACT
RRS-M2/1-1200 GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACT
RRS-M3/1-1500 GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACT
RRS-M4/1-777   GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACT
RRS-M5/1-1216 GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACT
RRS-M6/1-1190 GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACT
RRS-M7/1-1188 GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACT
RRS-M8/1-1490 GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACT
RRS-M9/1-1203 GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACT

RRS-REF/1-1562 CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTG
RRS-M1/1-795   CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTG
RRS-M2/1-1200 CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTG
RRS-M3/1-1500 CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTG
RRS-M4/1-777   CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTG
RRS-M5/1-1216 CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTG
RRS-M6/1-1190 CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTG
RRS-M7/1-1188 CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTG
RRS-M8/1-1490 CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTG
RRS-M9/1-1203 CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTG

RRS-REF/1-1562 GGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCT
RRS-M1/1-795   GGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCT
RRS-M2/1-1200 GGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCT

```

RRS-M3/1-1500 GGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCT  
RRS-M4/1-777 GGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCT  
RRS-M5/1-1216 GGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCT  
RRS-M6/1-1190 GGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCT  
RRS-M7/1-1188 GGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCT  
RRS-M8/1-1490 GGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCT  
RRS-M9/1-1203 GGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCT

RRS-REF/1-1562 TTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAA  
RRS-M1/1-795 TTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAA  
RRS-M2/1-1200 TTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAA  
RRS-M3/1-1500 TTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAA  
RRS-M4/1-777 TTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAA  
RRS-M5/1-1216 TTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAA  
RRS-M6/1-1190 TTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAA  
RRS-M7/1-1188 TTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAA  
RRS-M8/1-1490 TTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAA  
RRS-M9/1-1203 TTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAA

RRS-REF/1-1562 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCC  
 RRS-M1/1-795 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACAC-----  
 RRS-M2/1-1200 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCC  
 RRS-M3/1-1500 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCC  
 RRS-M4/1-777 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCC  
 RRS-M5/1-1216 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCC  
 RRS-M6/1-1190 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCC  
 RRS-M7/1-1188 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCC  
 RRS-M8/1-1490 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCC  
 RRS-M9/1-1203 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCC

RRS-REF/1-1562 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG  
 RRS-M1/1-795 -----  
 RRS-M2/1-1200 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG  
 RRS-M3/1-1500 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG  
 RRS-M4/1-777 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG  
 RRS-M5/1-1216 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG  
 RRS-M6/1-1190 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG  
 RRS-M7/1-1188 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG  
 RRS-M8/1-1490 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG  
 RRS-M9/1-1203 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG

RRS-REF/1-1562 CGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGG  
 RRS-M1/1-795 -----  
 RRS-M2/1-1200 CGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGG  
 RRS-M3/1-1500 CGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGG  
 RRS-M4/1-777 CGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGG  
 RRS-M5/1-1216 CGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGG  
 RRS-M6/1-1190 CGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGG  
 RRS-M7/1-1188 CGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGG  
 RRS-M8/1-1490 CGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGG  
 RRS-M9/1-1203 CGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGG

RRS-REF/1-1562 TCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGC  
 RRS-M1/1-795 -----  
 RRS-M2/1-1200 TCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGC  
 RRS-M3/1-1500 TCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGC  
 RRS-M4/1-777 TCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGC  
 RRS-M5/1-1216 TCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGC  
**RRS-M6**/1-1190 TCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGC  
 RRS-M7/1-1188 TCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGC  
 RRS-M8/1-1490 TCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGC

RRS-M9/1-1203 TCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGC

RRS-REF/1-1562 AGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGT  
RRS-M1/1-795 -----  
RRS-M2/1-1200 AGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGT  
RRS-M3/1-1500 AGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGT  
RRS-M4/1-777 AGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGT  
RRS-M5/1-1216 AGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGT  
RRS-M6/1-1190 AGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGT  
RRS-M7/1-1188 AGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGT  
RRS-M8/1-1490 AGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGT  
RRS-M9/1-1203 AGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGT

RRS-REF/1-1562 AGGTGGTTTGTGCGGTTGTTTCGTGAAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATA  
RRS-M1/1-795 -----  
RRS-M2/1-1200 AGGTGGTTTGTGCGGTTGTTTCGTGAAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATA  
RRS-M3/1-1500 AGGTGGTTTGTGCGGTTGTTTCGTGAAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATA  
RRS-M4/1-777 AGGTGGTTTGTGCGGTTGTTTCGTGAAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATA  
RRS-M5/1-1216 AGGTGGTTTGTGCGGTTGTTTCGTGAAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATA  
RRS-M6/1-1190 AGGTGGTTTGTGCGGTTGTTTCGTGAAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATA  
RRS-M7/1-1188 AGGTGGTTTGTGCGGTTGTTTCGTGAAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATA  
RRS-M8/1-1490 AGGTGGTTTGTGCGGTTGTTTCGTGAAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATA  
RRS-M9/1-1203 AGGTGGTTTGTGCGGTTGTTTCGTGAAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATA

RRS-REF/1-1562 CGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA  
RRS-M1/1-795 -----  
RRS-M2/1-1200 CGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA  
RRS-M3/1-1500 CGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA  
RRS-M4/1-777 CGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA  
RRS-M5/1-1216 CGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA  
RRS-M6/1-1190 CGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA  
RRS-M7/1-1188 CGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA  
RRS-M8/1-1490 CGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA  
RRS-M9/1-1203 CGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA

RRS-REF/1-1562 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGGA  
RRS-M1/1-795 -----  
RRS-M2/1-1200 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAG--  
RRS-M3/1-1500 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGC-----  
RRS-M4/1-777 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGC---  
RRS-M5/1-1216 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGC---  
RRS-M6/1-1190 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGC---  
RRS-M7/1-1188 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGG-  
RRS-M8/1-1490 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGC---  
RRS-M9/1-1203 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGC---

RRS-REF/1-1562 GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGG  
RRS-M1/1-795 -----  
RRS-M2/1-1200 -----  
RRS-M3/1-1500 -----GTGG  
RRS-M4/1-777 -----  
RRS-M5/1-1216 -----  
RRS-M6/1-1190 -----  
RRS-M7/1-1188 -----  
RRS-M8/1-1490 -----  
RRS-M9/1-1203 -----

RRS-REF/1-1562 GTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCC  
RRS-M1/1-795 -----  
RRS-M2/1-1200 -----  
RRS-M3/1-1500 GTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCC  
RRS-M4/1-777 -----  
RRS-M5/1-1216 -----  
RRS-M6/1-1190 -----  
RRS-M7/1-1188 -----  
RRS-M8/1-1490 -----GTGGGTTTCCTTCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCC

```

RRS-M9/1-1203 -----

RRS-REF/1-1562 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
RRS-M1/1-795 -----
RRS-M2/1-1200 -----
RRS-M3/1-1500 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
RRS-M4/1-777 -----
RRS-M5/1-1216 -----
RRS-M6/1-1190 -----
RRS-M7/1-1188 -----
RRS-M8/1-1490 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
RRS-M9/1-1203 -----

RRS-REF/1-1562 GGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCA
RRS-M1/1-795 -----
RRS-M2/1-1200 -----
RRS-M3/1-1500 GGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCA
RRS-M4/1-777 -----
RRS-M5/1-1216 -----
RRS-M6/1-1190 -----
RRS-M7/1-1188 -----
RRS-M8/1-1490 GGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCA
RRS-M9/1-1203 -----

RRS-REF/1-1562 CAGGACGCGTCTAGAGATAGGCGTTCCCTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGT
RRS-M1/1-795 -----
RRS-M2/1-1200 -----
RRS-M3/1-1500 CAGGACGCGTCTAGAGATAGGCGTTCCCTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGT
RRS-M4/1-777 -----
RRS-M5/1-1216 -----
RRS-M6/1-1190 -----
RRS-M7/1-1188 -----
RRS-M8/1-1490 CAGGACGCGTCTAGAGATAGGCGTTCCCTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGT
RRS-M9/1-1203 -----

RRS-REF/1-1562 CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCA
RRS-M1/1-795 -----AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCA
RRS-M2/1-1200 -----
RRS-M3/1-1500 CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCA
RRS-M4/1-777 -----
RRS-M5/1-1216 -----GCGCAACCCTTGTCTCA
RRS-M6/1-1190 -----

```

RRS-M7/1-1188 -----  
RRS-M8/1-1490 CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCTCA  
RRS-M9/1-1203 -----TCTCA

RRS-REF/1-1562 TGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG  
RRS-M1/1-795 TGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG  
RRS-M2/1-1200 TGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG  
RRS-M3/1-1500 TGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG  
RRS-M4/1-777 -----  
RRS-M5/1-1216 TGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG  
RRS-M6/1-1190 -----CACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG  
RRS-M7/1-1188 -----TAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG  
RRS-M8/1-1490 TGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG  
RRS-M9/1-1203 TGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG

RRS-REF/1-1562 GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATG  
RRS-M1/1-795 GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATG  
RRS-M2/1-1200 GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATG  
RRS-M3/1-1500 GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATG  
RRS-M4/1-777 -----  
RRS-M5/1-1216 GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATG  
RRS-M6/1-1190 GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATG  
RRS-M7/1-1188 GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATG  
RRS-M8/1-1490 GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATG  
RRS-M9/1-1203 GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATG

RRS-REF/1-1562 GCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGT  
RRS-M1/1-795 GCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGT  
RRS-M2/1-1200 GCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGT  
**RRS-M3**/1-1500 GCCGGCACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGT  
RRS-M4/1-777 -----  
RRS-M5/1-1216 GCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGT  
RRS-M6/1-1190 GCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGT  
RRS-M7/1-1188 GCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGT  
RRS-M8/1-1490 GCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGT  
RRS-M9/1-1203 GCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGT

RRS-REF/1-1562 TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG  
RRS-M1/1-795 TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG  
RRS-M2/1-1200 TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG  
RRS-M3/1-1500 TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG  
RRS-M4/1-777 -----

RRS-M5/1-1216 TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG  
RRS-M6/1-1190 TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG  
RRS-M7/1-1188 TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG  
RRS-M8/1-1490 TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG  
RRS-M9/1-1203 TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG

RRS-REF/1-1562 CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGT  
RRS-M1/1-795 CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGT  
RRS-M2/1-1200 CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGT  
RRS-M3/1-1500 CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGT  
RRS-M4/1-777 -----  
RRS-M5/1-1216 CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGT  
RRS-M6/1-1190 CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGT  
RRS-M7/1-1188 CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGT  
RRS-M8/1-1490 CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGT  
RRS-M9/1-1203 CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGT

RRS-REF/1-1562 CGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCTCGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGG  
RRS-M1/1-795 CGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCTCGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGG  
RRS-M2/1-1200 CGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCTCGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGG  
RRS-M3/1-1500 CGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCTCGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGG  
RRS-M4/1-777 -----  
RRS-M5/1-1216 CGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCTCGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGG  
RRS-M6/1-1190 CGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCTCGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGG  
RRS-M7/1-1188 CGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCTCGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGG  
RRS-M8/1-1490 CGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCTCGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGG  
RRS-M9/1-1203 CGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCTCGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGG

RRS-REF/1-1562 CGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT  
RRS-M1/1-795 CGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT  
RRS-M2/1-1200 CGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT  
RRS-M3/1-1500 CGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT  
RRS-M4/1-777 -----  
RRS-M5/1-1216 CGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT  
RRS-M6/1-1190 CGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT  
RRS-M7/1-1188 CGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT  
RRS-M8/1-1490 CGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT  
**RRS-M9/1-1203** CGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT

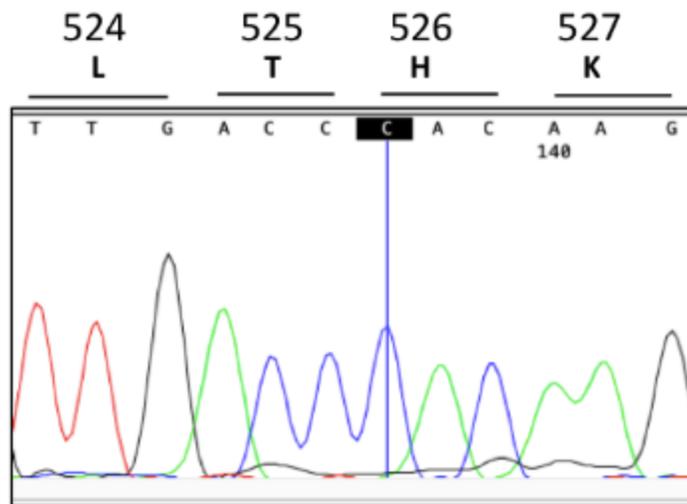
RRS-REF/1-1562 TT  
RRS-M1/1-795 TT  
RRS-M2/1-1200 TT

RRS-M3/1-1500	TT
RRS-M4/1-777	--
RRS-M5/1-1216	TT
RRS-M6/1-1190	TT
RRS-M7/1-1188	TT
RRS-M8/1-1490	TT
RRS-M9/1-1203	TT

El análisis de las secuencias del gen *rrs* muestra la presencia de tres mutaciones en las muestras 3, 6 y 9, como se resalta en negrita, con las mutaciones indicadas en color rojo. En la muestra 3, se observa un cambio de timina a citosina (mutación T1239C); en la muestra 6, se presenta una inversión de citosina por timina (mutación C492T); mientras que en la muestra 9, se registra un cambio de timina a guanina (mutación T1505G).

### Figura 29

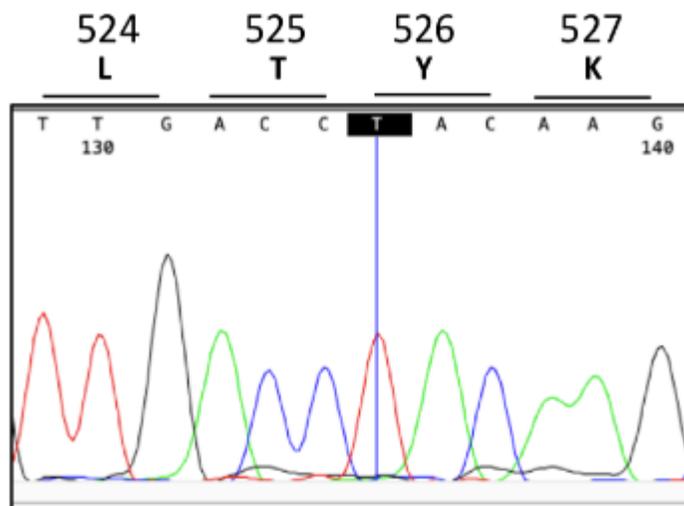
*Análisis de la secuencia de la cepa de referencia H37Rv en la región rpoB526*



Nota. Se muestra el electroferograma obtenido mediante el software FinchTV. En la posición 526 del gen *rpoB*, el codón CAC codifica para el aminoácido Histidina.

**Figura 30**

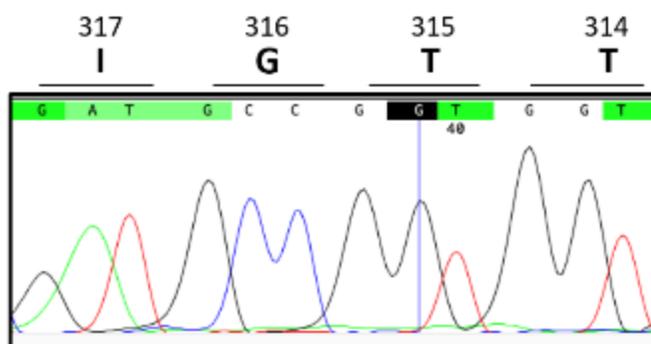
*Análisis de la region rpoB526 mutada.*



Nota. Se muestra el electroferograma obtenido mediante el software FinchTV. El análisis de la secuencia de la región determinante de la resistencia a RMP en la muestra 3 reveló mutación en el codón 526 provocando la sustitución del a.a Histidina por Tirosina (H526Y).

**Figura 31**

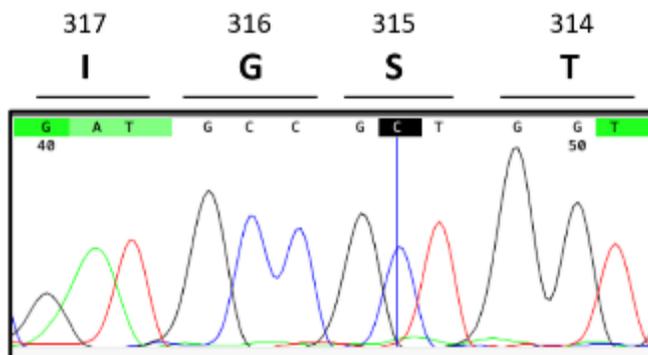
*Análisis de la secuencia de la cepa H37Rv en la región*



Nota. En la figura se muestra el electroferograma [obtenido mediante el software FinchTv (versión 1.4.0)] reverso complementaria de la región katG315. En la posición 315 del gen katG, se puede observar que el codón es GCT, cuya secuencia reversa complementaria es AGC que codifica para el aminoácido Serina.

**Figura 32**

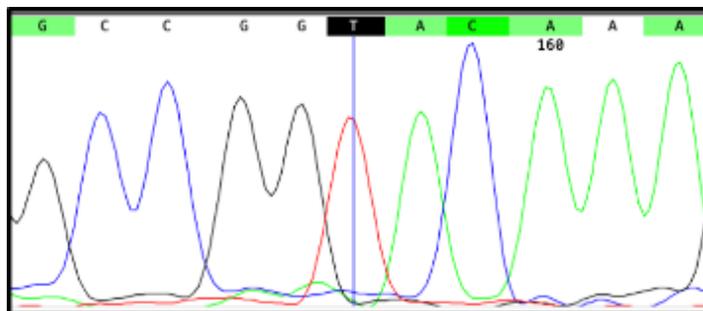
*Análisis de la región katG315 mutada*



Nota. En la posición 315 del gen *katG* de la muestra número 3, se identifica un cambio de bases nitrogenadas en el codón, de GCT por GGT, cuya secuencia reversa complementaria es ACC y este cambio de guanina por citocina provoca un cambio de aminoácidos de serina a treonina.

**Figura 33**

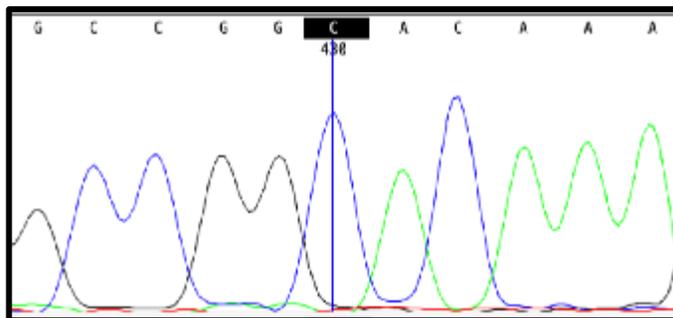
*Electroferograma de la cepa de referencia H37Rv en la posición 1239 del gen rrs*



Nota. Se muestra electroferograma obtenido en la posición 1239 del gen *rrs*.

**Figura 34**

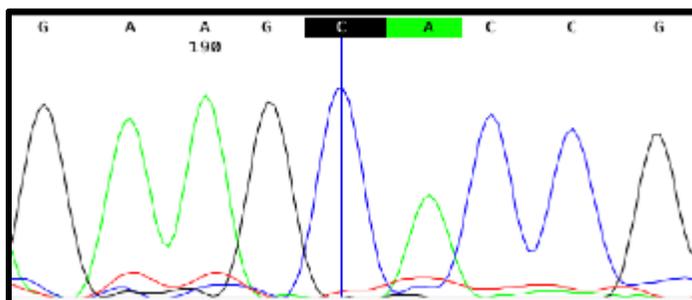
*Electroferograma de la muestra 3 en la posición 1239 del gen rrs*



Nota. Comparando el electroferograma de la muestra 3 con el de la cepa de referencia H37Rv se observa una mutación en el nucleótido 1239, dónde se sustituye una timina (T) por una citosina (C), dando lugar a la mutación T1239C en el gen *rrs*.

**Figura 35**

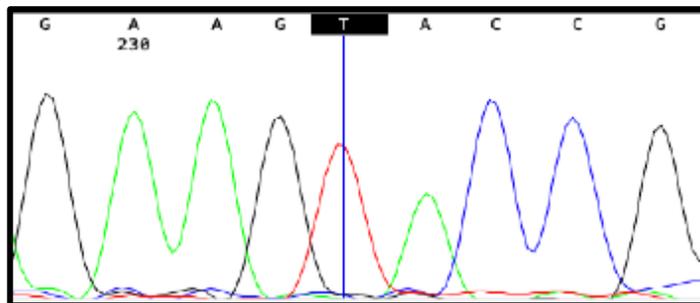
*Electroferograma de la cepa de referencia H37Rv en la posición 492 del gen rrs.*



Nota. Se muestra electroferograma obtenido en la posición 492 del gen *rrs*.

**Figura 36**

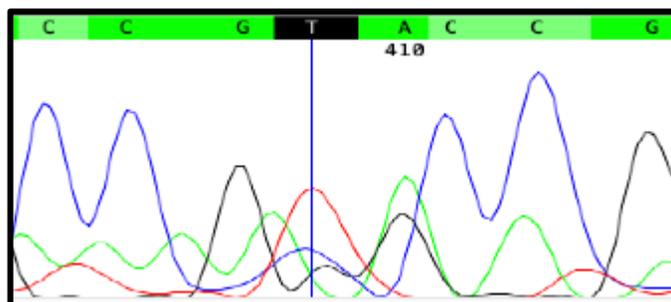
*Electroferograma de la muestra 6 en la posición 492 del gen rrs.*



Nota. Comparando el electroferograma de la muestra 6 con el de la cepa de referencia H37Rv se observa una mutación en el nucleótido 492, dónde se sustituye una citosina (C) por una timina (T), dando lugar a la mutación C492T en el gen *rrs*.

**Figura 37**

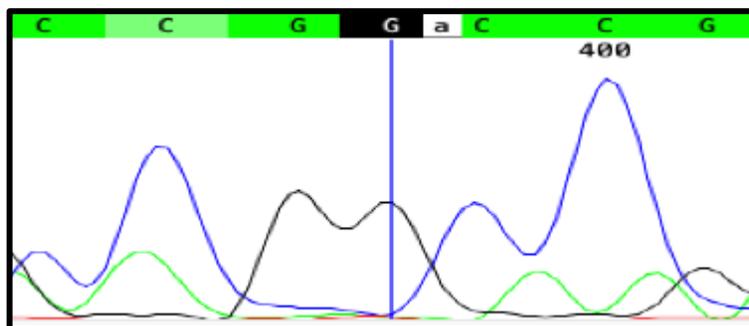
*Electroferograma de la cepa de referencia H37Rv en la posición 1505 del gen rrs*



Nota. Se muestra electroferograma obtenido mediante el software FinchTv (versión 1.5) en la posición 1505 del gen *rrs*.

**Figura 38**

*Electroferograma de la muestra 9 en la posición 1505 del gen rrs.*



Nota. Comparando el electroferograma de la muestra 9 con el de la cepa de referencia H37Rv se observa una mutación en el nucleótido 1505, dónde se sustituye una timina (T) por una guanina (G), dando lugar a la mutación T1505G en el gen *rrs*.

**Asociación entre mutación y farmacorresistencia**

Los resultados obtenidos confirmaron que la mutación H526Y identificada en la muestra 3 es la causa de la resistencia a la rifampicina, como se demostró en los ensayos de laboratorio. Ninguna de las otras muestras analizadas mostró resistencia a la rifampicina, y tampoco se encontraron mutaciones en el gen *rpoB*.

En cuanto a la mutación S315T identificada en la muestra 3 a partir de los resultados del cultivo *in vitro*, es probable que sea responsable de la resistencia fenotípica a la isoniacida. Sin embargo, no se puede afirmar completamente esto debido a que, excepto por las muestras 4 y 8, todas las demás mostraron resistencia a la isoniacida a pesar de no tener mutaciones en las secuencias analizadas de los genes *katG* e *inhA*, que se sabe que están asociadas con la resistencia.

Los resultados revelaron la presencia de tres mutaciones en las muestras 3, 6 y 9. En la muestra 3 se encontró la mutación T1239C, y la prueba de susceptibilidad *in vitro* solo mostró resistencia a la estreptomycin. En la muestra 6 se halló la mutación C492T, y la prueba de susceptibilidad mostró resistencia tanto a la estreptomycin como a la capreomicin. Finalmente,

en la muestra 9 se identificó la mutación T1505G, y la prueba de susceptibilidad también indicó resistencia a la estreptomicina, así como una baja sensibilidad a la capreomicina.

## Discusiones

Los hallazgos de farmacoresistencia *in vitro* muestran una resistencia considerable a rifampicina en un aislado, lo que resalta la variabilidad de la susceptibilidad a este fármaco y sugiere la posible influencia de la metodología de inoculación en los resultados de la CMI. Estas observaciones son cruciales ya que la resistencia a rifampicina es un indicador de TB-MDR y su presencia, aunque baja, sugiere un riesgo de propagación de cepas resistentes.

En el análisis fenotípico de resistencia a la rifampicina (RMP), se determinó que una de las nueve muestras de *Mycobacterium tuberculosis* (11.1%) exhibió resistencia, mientras que el resto mostró variaciones en la concentración mínima inhibitoria (CMI), con 6/9 muestras (66.6%) presentando una CMI  $\leq 0.25$   $\mu\text{g/ml}$  y dos muestras (22.2%) con CMI superiores a 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . Este rango de concentraciones puede atribuirse a la carga de inóculo utilizada para el ensayo, que no fue ajustada a la escala de McFarland como se recomienda, sino que se basó en una dilución 1:20 de una cantidad fija de 100  $\mu\text{l}$  del inóculo.

Al investigar la resistencia genética a RMP, se encontró una mutación en el codón 526 de la región hipervariable del gen *rpoB* en una muestra, que normalmente codifica para la histidina y que fue reemplazada por tirosina (H526Y). Este cambio nucleotídico (CAC $\rightarrow$ TAC) es consistente con la literatura global, siendo la segunda mutación más comúnmente reportada en cepas resistentes a RMP. Este hallazgo refuerza la asociación entre las mutaciones en el gen *rpoB* y la resistencia fenotípica a RMP, apoyando la utilización de la secuenciación genética para la detección temprana de la resistencia.

La mutación H526Y en el gen *rpoB* es particularmente significativa, confirmando su papel en la resistencia a rifampicina y resaltando la importancia de la genotipificación para la detección temprana de resistencia. Este es un punto crucial, ya que la resistencia monodroga a RMP es rara, indicando que las cepas con esta mutación podrían ser resistentes a otros antifímicos, especialmente isoniazida, lo que complica el tratamiento y reduce las tasas de curación.

La resistencia a isoniazida también fue alta en este estudio, lo que está en línea con otros hallazgos globales que identifican a INH como el fármaco más comúnmente resistido. Esto plantea preocupaciones graves sobre las opciones de tratamiento para los pacientes, especialmente porque la TB-MDR requiere regímenes de tratamiento más largos y menos efectivos. Además, la correlación entre la resistencia fenotípica a INH y la presencia de mutaciones en los genes *katG* e

inhA no fue concluyente, lo que sugiere que otros mecanismos genéticos podrían estar involucrados. La secuenciación completa de estos genes podría proporcionar una imagen más clara de la resistencia a INH.

En cuanto a la isoniazida (INH), el 77.7% de las muestras (7/9) mostraron alta resistencia fenotípica in vitro ( $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$ ), y una de estas muestras también fue resistente a RMP, señalando la presencia de TB multidrogorresistente (TB-MDR). Es preocupante que la resistencia a INH es la forma más común de resistencia a medicamentos, ya sea por sí sola o en combinación con otros medicamentos, lo que compromete la efectividad del tratamiento y disminuye la tasa de curación del 100 al 60%.

El análisis genotípico reveló que solo una muestra contenía la mutación S315T en el gen katG, una mutación puntual en el nucleótido 944 (AGC $\rightarrow$ ACC), la cual se reporta en hasta el 94% de los aislados clínicos resistentes a INH. Sin embargo, no se detectaron mutaciones en la región del gen inhA en las muestras examinadas, lo que sugiere que la resistencia a INH podría estar mediada por otros mecanismos genéticos. Esto nos lleva a considerar la posibilidad de secuenciar completamente los genes katG e inhA y su región promotora, así como de investigar otros genes relacionados con la resistencia a INH en *Mycobacterium tuberculosis*.

Dada la prevalencia de TB y TB-MDR en la región, y considerando que solo el 24% de las personas con TB son diagnosticadas por los servicios de salud en Chiapas, México, estos resultados son alarmantes y resaltan la necesidad de mejorar las estrategias de diagnóstico y tratamiento. Además, se observó resistencia a estreptomycin en el 77.7% de los aislados, lo que probablemente se deba al uso prolongado de este antibiótico desde su descubrimiento en 1943, y se encontró una sensibilidad moderada a kanamicina y una alta resistencia a capreomicina en el 33.3% de las muestras.

Se identificaron mutaciones adicionales como T1239C, C492T y T1505G en las muestras, lo que implica una compleja red de resistencia que abarca varios genes y sugiere la necesidad de un enfoque más amplio para comprender la resistencia farmacológica en *Mycobacterium tuberculosis*.

La prevalencia de TB y TB-MDR en la región de estudio y la baja tasa de diagnóstico subrayan la necesidad de mejorar la vigilancia y el tratamiento. Además, se observó resistencia a estreptomycin, lo que refleja la adaptación bacteriana a largo plazo al uso de antifímicos. La resistencia a segundos líneas de fármacos como la capreomicina y la kanamicina también fue

notable, lo que sugiere la necesidad de monitorear y entender mejor las mutaciones que confieren resistencia.

Finalmente, el fenómeno migratorio y los factores socioeconómicos en México resaltan la necesidad de estrategias de salud pública más robustas para combatir la TB. La presencia de factores de riesgo como la desnutrición y la inmunosupresión también deben ser considerados en las estrategias de prevención y tratamiento. Este estudio refuerza la importancia de una comprensión integral de la resistencia a fármacos en TB, que debe incluir tanto enfoques fenotípicos como genotípicos para el manejo eficaz de esta enfermedad.

## Conclusiones

La farmacoresistencia *in vitro* en el análisis fenotípico de cepas resistentes a rifampicina determina un riesgo y es un indicador de TB-MDR. Un aislado exhibió resistencia y 6 de 9 aislados (66.6%) presentaron una CMI en un rango de concentraciones de  $\leq 0.25$   $\mu\text{g/ml}$  y dos aislados (22.2%) con CMI superiores a  $0.5$   $\mu\text{g/ml}$ . La resistencia genética a RMP presentó una mutación en el codón 526 de la región hipervariable del gen *rpoB* en una muestra, que normalmente codifica para la histidina y que fue reemplazada por tirosina (H526Y). Este cambio nucleotídico (CAC $\rightarrow$ TAC) es la segunda mutación más comúnmente reportada en literatura en cepas resistentes a RMP, esto refuerza la asociación entre las mutaciones en el gen *rpoB* y la resistencia fenotípica a RMP, reforzando la utilización de la secuenciación genética para la detección temprana de la resistencia.

La resistencia a isoniazida fue alta en este estudio el 77.7% de los aislados (7/9) presentó resistencia fenotípica *in vitro* ( $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$ ), el análisis genotípico reveló que solo una muestra contenía la mutación S315T en el gen *katG*, una mutación puntual en el nucleótido 944 (AGC $\rightarrow$ ACC), la cual se reporta en hasta el 94% de los aislados clínicos resistentes a INH. Sin embargo, no se detectaron mutaciones en la región del gen *inhA*, lo que sugiere que la resistencia a INH podría estar mediada por otros mecanismos genéticos. Esto nos lleva a considerar la posibilidad de secuenciar completamente los genes *katG* e *inhA* y su región promotora, así como de investigar otros genes relacionados con la resistencia a INH. Además, se observó resistencia a estreptomicina en el 77.7% de los aislados, lo que probablemente se deba al uso prolongado de este antibiótico, y se encontró una sensibilidad moderada a kanamicina y una alta resistencia a capreomicina en el 33.3% de las muestras.

Se identificaron mutaciones adicionales como T1239C, C492T y T1505G, lo que implica una compleja red de resistencia que abarca varios genes y sugiere la necesidad de un enfoque más amplio para comprender la resistencia farmacológica.

La prevalencia de TB y TB-MDR en la región de estudio y la baja tasa de diagnóstico subrayan la necesidad de mejorar la vigilancia y el tratamiento que debe incluir tanto enfoques fenotípicos como genotípicos para el manejo eficaz de esta enfermedad.

## Referencias

- Broccolo, F., Scarpellini, P., Locatelli, G., Zingale, A., Brambilla, A. M., Cichero, P., Sechi, L. A., Lazzarin, A., Lusso, P., & Malnati, M. S. (2003). Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* load by two real-time calibrated PCR assays. *J Clin Microbiol*, 41(10), 4565-4572. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4565-4572.2003>
- Nour, M. S., El-Shokry, M. H., Shehata, I. H., & Abd-El Aziz, A. M. (2013). Evaluation of rezasurin microtiter assay and high resolution melting curve analysis for detection of rifampicin and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Clin Lab*, 59(7-8), 763-771. <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2012.120618>
- Parsons, L. M., Salfinger, M., Clobridge, A., Dormandy, J., Mirabello, L., Polletta, V. L., Sanic, A., Sinyavskiy, O., Larsen, S. C., Driscoll, J., Zickas, G., & Taber, H. W. (2005). Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(6), 2218-2225. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2218-2225.2005>
- Chaoui, I., Sabouni, R., Kourout, M., Jordaan, A. M., Lahlou, O., Elouad, R., Akrim, M., Victor, T. C., & El Mzibri, M. (2009). Analysis of isoniazid, streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Morocco. *J Infect Dev Ctries*, 3(4), 278-284. <https://doi.org/10.3855/jidc.125>
- Ramaswamy, S. V., Dou, S. J., Rendon, A., Yang, Z., Cave, M. D., & Graviss, E. A. (2004). Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol*, 53(Pt 2), 107-113. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05343-0>
- Aidar, O., Ambroggi, M., Arevalo, J., Brian, M., y Canedo, E. (2010). *Guías de diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis*. <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoid=70109>
- Bailo, R., Bhatt, A., y Ainsa, J. A. (2015). Lipid transport in *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in virulence and drug development, 96(3), 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.001>
- Bailo, R., Bhatt, A., y Ainsa, J. A. (2015). Lipid transport in *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in virulence and drug development. *Biochemical Pharmacology*, 96(3), 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.001>
- Barry, C. E., Boshoff, H. I., Dartois, V., Dick, T., Ehrt, S., Flynn, J., . . . Young, D. (2009). The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the goals of prophylaxis.. 2009;7(12):845-855. doi:. *Nat Rev Microbiol*, 7(12), 845-855. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2236>

- Caminero-Luna, J. A. (2016). Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pulmonar. *Revista Clínica Especializada*, 216(2), 76-84.  
<https://doi.org/10.1016/j.rce.2015.09.005>
- Cardona, P. (2018). Patogenia de la tuberculosis y otras micobacteriosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 36(1), 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.10.015>.
- Cardona, P. J. (2018). Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin*, 36(1), 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2017.10.009>
- CENAPRECE. (7 de 12 de 2021). *Programa de Accion Especifico*. Programa Nacional de prevención y control de las micobacterias (tuberculosis y lepra):  
<http://www.gob.mx/salud/cenaprece>
- Chiapas, A. (18 de noviembre de 2018). Mas de 95% de los Municipios de Chiapas presentan casos de Tuberculosos. <https://alertachiapas.com/2018/03/16/mas-del-95-por-ciento-de-los-municipios-de-chiapas-presentan-casos-de-tuberculosis/>. Published 2018
- Delagou, G., Sali, M., y Fadda, G. (2013). The biology of mycobacterium tuberculosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 5(1), e2013070. <https://doi.org/10.4084/mjhid.2013.070>
- Delogu, D., Sali, M., y Fadda, G. (2013). The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Revista Mediterránea de Hematología y Enfermedades Infecciosas*, 5(1).  
<https://doi.org/https://doi.org/10.4084/MJHID.2013.070>
- Flores Treviño, S. M. (2013). *Caracterización Genotípica de aislamientos clínicos de Mycobacterium tuberculosis: Perfiles de resistencia a antifímicos y mutaciones en genes asociados a la resistencia*.  
<https://cd.dgb.uanl.mx/bitstream/handle/201504211/16633/21199.pdf;sequence=1>
- Fontalvo\_Rivera, D., y Gomez-Camargo, D. (2015). Genes del mycobacterium tuberculosis involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Med UIS*, 28(1), 39-51.  
[https://doi.org/http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-03192015000100004&lng=en&tlng=es](https://doi.org/http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-03192015000100004&lng=en&tlng=es)
- Ghazaei, C. (2018). Mycobacterium tuberculosis and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *J res Med Sci*, 23(63). [https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS\\_904\\_17](https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_904_17)
- globally, T. d.-r. (2016). *Final report and recomendations*. The review on microbial resistance:  
[https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)
- Hazbon, M. H., Brimaconbe, M., Del valle, M. B., Cavatore, M., Guerrero, M. I., Varma-Basil, M., . . . Gaecia\_garcia, I. (2006). . Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *antimicrob Agents Chemother*, 50(8), 2640-2649. <https://doi.org/10.1128/AAC.00112-06>

- Jassal , M., y Bishai, W. R. (2009). Extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 9(1), 19-30. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70260-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70260-3)
- Kosh, A., y Mizrahi, V. (2018). Mycobacterium tuberculosis. *Tendencias Microbiol*, 26(5), 555-556. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.012>
- Murray, P. R. (2017). *Medical Microbiology. Vol 106*. elsevier health Sciences.
- Musser, j. M. (1995). Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev*, 8(4), 496-514. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.496>
- OMS. (1997). *Tratamiento de La Tuberculosis Directrices Para Los Programas Nacionales*.
- OMS. (2020). *Estrategia Mundial de Investigación e Innovación contra la tuberculosis*. <https://www.jstor.org/stable/resrep48277.5>
- OPS. (2008). *Manual para el Diagnostico Bacteriológico de la Tuberculosis Parte II Cultivo*. OMS.
- Orozco-andrade, I., Bravo-Rodriguez, G., y Dimakis-Ramirez, D. A. (2015). Determinación del interferón-gamma en tuberculosis : Principios básicos y UTILIDAD. 74(3), 197-206. <https://doi.org/https://www.medigraphic.com/pdfs/neumo/nt-2015/nt153g.pdf>
- Pai, M., Berh, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., . . . Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. Cartillas para enfermedades. *Nat Rev Dis*, 2. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Park, S. H., y Bendelac, A. (2000). CD1–restricted T cell responses and microbial infection. *Nature* 2000;406:788–92. *Nature*, 406(6797), 788-792. <https://doi.org/10.1038/35021233>
- Parsons, L. M. (2005). Phenotypic and Molecular Characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates resistant to both Isoniazid and Ethambutol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2218-2225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/aac.49.6.2218-2225.2005>
- Paulson, T. (2013). Epidemiology: a mortal foe. *Nature*. *Nature*, 502(7470), s2-3. [https://doi.org/\(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24108078\)](https://doi.org/(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24108078))
- Perdigão, J., y Portugal, I. (2019). Genetics and roadblocks of drug resistant tuberculosis,infection, *Genetics and evolution*. 72, 113-130. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.023>.
- Ramaswamy , S. V., Dou, S.-J., y Rendon, A. (2004). Genotypic analysis of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Monterrey, México. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 107–113. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05343-0>
- Ruiz, A. V., Moreno, S., y Alvar-Ezquerria. (2006). *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Médica Panamericana.

- Sanou, A., Bañuls, A. V., Godreuil, S., y Van Anh, N. T. (2015). Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal Medical Microbiology*, 64(11), 1261-1269. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000171>
- Secretaria de Salud, C. (20 de diciembre de 2023). *En chiapas la Tuberculosis esta controlada*. <http://saludchiapas.gob.mx/en-chiapas-la-tuberculosis-esta-controlada/>
- SSA. (2009).
- SSA. (2009). [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-03192015000100004&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-03192015000100004&lng=en&tlng=es). OMS.
- SSA. (01 de diciembre de 2021). *situación Epidemiológica en México*. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/722796/...> · Archivo PDF
- Trabulsi, L. R. (2015). *Microbiologia*. Atheneu.
- Treviño, S. M. (01 de noviembre de 2013). CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE Mycobacterium tuberculosis: PERFILES DE RESISTENCIA A ANTIFÍMICOS Y MUTACIONES EN GENES ASOCIADOS A RESISTENCIA. Monterrey, Nuevo León, México.
- Tuberculosis. (2021). *Global Report Tuberculosis*. OMS. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/346387/9789240037021-eng.pdf?sequence=1>
- Tuberculosis, G. R. (2012). *Global Report Tuberculosis*. OMS.
- Tuberculosis, G. R. (2018). *Global Tuberculosis report*. OMS. ([https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en))
- Tuberculosis, G. R. (2023). OMS. <https://doi.org://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023/tb-disease-burden/1-1-tb-incidence>
- Tuyiringire, N., Tusubira, D., Munyampundu, J. P., Tolo, C. U., Muvunyi, C. M., y Ogwang, P. E. (2018). Aplicación de la metabolómica al descubrimiento de fármacos y comprensión de los mecanismos de acción de las plantas medicinales con actividad. *Medicina Clínica y Traslacional*, 7(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0208-3.7>
- Unidos, B. N. (2004). *Centro Nacional de Información Biotecnológica*. Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos Centro Nacional de Isoniazida Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/#query=C6H7N3O>
- Wolinsky E, R. A. (1948). Drug-resistant tubercle bacilli in patients under treatment with streptomycin. *Am Rev Tuberc*, 58(3), 335-343.