

CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTACIONES PRESENTES EN
AISLAMIENTOS COLOMBIANOS DE *Mycobacterium
tuberculosis* MULTIRRESISTENTES, COMO INSUMO PARA EL
DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA MOLECULAR PARA EL
DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE
Y EXTREMADAMENTE RESISTENTE

Luz Maira Wintaco Martínez

Instituto Nacional de Salud Dirección de Investigación en Salud Pública
Subdirección Investigación Ciencia y Tecnología-Grupo de Micobacterias

Universidad el Bosque
Facultad de Ciencias, División de Investigaciones
Bogotá D.C., Colombia

2014

CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTACIONES PRESENTES EN
AISLAMIENTOS COLOMBIANOS DE *Mycobacterium tuberculosis*
MULTIRRESISTENTES, COMO INSUMO PARA EL DESARROLLO DE
UNA METODOLOGÍA MOLECULAR PARA EL DIAGNOSTICO DE
TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE Y EXTREMADAMENTE
RESISTENTE

Luz Maira Wintaco Martínez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

DIRECTORA:

Dra. Martha Inírida Guerrero Guerrero MSc

Investigadora Senior

Universidad el Bosque

Facultad de Ciencias, División de Investigación

Bogotá D.C., Colombia

2014

Dedicatoria

A mi padre Reinaldo Wintaco Morales el cual nos dejó las mejores enseñanzas y ejemplo de vida, a mi madre Luz Marina Martínez Higuera y hermanos Camilo y Andrés por todo su apoyo y comprensión durante el proceso de formación de Posgrado.

"Cuando la gratitud es tan absoluta las palabras sobran"

Álvaro mutis

Agradecimientos

Esta tesis fue desarrollada bajo el marco del proyecto “Desarrollo de una plataforma molecular para el diagnóstico de MDR y XDR de *Mycobacterium tuberculosis*. Financiado por Colciencias con el código 210451929060. Y fue desarrollada en su totalidad por el Grupo de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud CETIN: 021-2010, en colaboración académica con el Grupo de Investigación Molecular de Micobacterias del Instituto Osvaldo Cruz dirigido por el Dr. Philip Suffys.

Al Dr. Philip Suffys y a la Dra. Sidra Vasconcellos, así como a todo su equipo de trabajo agradezco inmensamente por toda su colaboración, apoyo y enseñanzas tanto a nivel profesional, como personal durante las pasantías realizadas en este.

Quiero agradecerle a la Dra. Martha Inírida, por todas sus enseñanzas y conocimientos transmitidos de toda una trayectoria como investigadora, y en especial por haberme tenido la confianza como estudiante de maestría durante el desarrollo de este proyecto.

Al Instituto Nacional de Salud, especialmente a todos mis compañeros del Grupo de Micobacterias Investigación, el cual me ha dado la oportunidad de hacer parte de este y he tenido la satisfacción de cultivar estos años de experiencia profesional y personal, además la confianza para desarrollar este proyecto y realizar mis pasantías en el Instituto FIOCRUZ.

I Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, que fue declarada en 1993 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como una emergencia sanitaria mundial, desde entonces los esfuerzos por controlar la enfermedad no han parado y se han diseñado diferentes estrategias para combatirla, pero su control parece estar cada vez más alejado con el surgimiento de resistencia a los diferentes medicamentos antituberculosos usados para combatir el *M. tuberculosis*. De esta situación se desprende la tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR), la cual presenta resistencia a por lo menos dos de las principales medicamentos usados en el tratamiento como son: rifampicina e isoniazida. La cual se puede convertir en tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR), cuando además hay resistencia a fluoroquinolonas y a un inyectable de segunda línea (capreomicina/kanamicina/amikacina).

Con el objetivo de identificar y describir por primera vez en el país las mutaciones, asociados con resistencia a medicamentos antituberculosos, presentes en regiones específicas de cada uno de los siete blancos moleculares seleccionados, se tomaron del biobanco, aislamientos recolectados en los últimos 10 años: 130 aislamientos MDR y 30 aislamientos susceptibles, a los medicamentos de primera línea, junto con cepas ATCC como control; a los cuales se habían clasificados previamente por el método de referencia de las Proporciones Múltiples, usado para determinar la sensibilidad a los medicamentos antituberculosos, además se les había realizado previamente genotipificación mediante por spoligotyping.

Se realizó la recuperación de los aislamientos en medio de cultivo líquido, con el fin de obtener una biomasa bacilar considerable, para realizar la posterior extracción del ADN y evaluación de la calidad del mismo, cuantificándolo correctamente. Se diseñaron siete pares de iniciadores para la amplificación de los siete blancos moleculares a amplificar: *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *gyrA*, *rrs*, y *tlyA*, los cuales fueron seleccionados para brindar información de resistencia a medicamentos de primera y segunda línea, que contribuya a la detección de aislamientos MDR y XDR. Se realizó la estandarización de las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de los 7 blancos moleculares de los aislamientos seleccionados para un total de 1120 amplificaciones. Se purificaron los productos amplificados, para realizar su secuenciación automática mediante el analizador genético ABI PRISMA® 3100 Applied Biosystems, USA. Los resultados de estas secuenciaciones se analizaron con el software SeqScape v.3.0 de Applied Biosystems, diseñado para la detección, análisis y confirmación de mutaciones.

En el gen *rpoB* de los aislamientos colombianos MDR encontramos las mutaciones ya descritas en proporciones similares a las reportadas, siendo S531L, la más frecuente y además encontramos 6 mutaciones no reportadas previamente (D435V, V477M, E588K, S600T, I603S, V662F) las cuales podrían conferirles resistencia a rifampicina porque a pesar de estar fuera de región RRDR, no son sinónimas ni fueron encontradas combinadas con otras ya reportadas como causantes de resistencia a rifampicina.

Entre los 130 aislamientos MDR, el 44,6% presentaron la mutación S315T en el gen *katG*, mutación que se ha reportado que ocurre a distintas tasas en los diferentes países y por otra parte,

encontramos otras mutaciones en el codón 315 (S315N, S315I) y además, el 28% de estos aislamientos MDR portan mutaciones en codones diferentes al 315, los cuales también pasarían desapercibidas por los métodos comerciales. El 9,2% y el 22,9% de los aislamientos colombianos no presentan mutaciones en el en *rpoB* y *katG* respectivamente.

En lo referente al estudio de los blancos moleculares para detección de resistencia a medicamentos de segunda línea: *gyrA*, *tlyA* y *rrs*, nuestros resultados son los primeros que se realizan con aislamientos de todo el país y los únicos con un número considerable de aislamientos MDR, por lo tanto son de gran valor en el contexto de la salud pública y de la resistencia a los medicamentos.

En el gen *gyrA*, se encontró una alta proporción (94%) de aislamientos con la mutación S95T, esta mutación se ha reportado en aislamientos de Venezuela y de China y no se encuentra asociada con resistencia a las fluoroquinolonas. La mutación en el codón 94, fuertemente asociada con resistencia a fluoroquinolonas, es exótica porque solo 1 aislamiento la presentó pero en cambio, detectamos tres sitios calientes para mutaciones en los aislamientos colombianos.

Teniendo en cuenta que mutaciones de resistencia a fluoroquinolonas en los aislamientos MDR, son marcadores de aislamientos pre-XDR, nuestros hallazgos en *gyrA* (12,8% con mutaciones), cobran gran importancia en el contexto nacional, por lo cual deben ser vigilados y estudiados más profundamente.

Los genes *tlyA* y *rrs* han sido menos estudiados que *gyrA*, por lo tanto nuestros hallazgos son novedosos y permiten ratificar que hace falta realizar más estudios al respecto para dilucidar su contribución real en la detección de aislamientos XDR.

Para el gen *tlyA* en los aislamientos colombianos encontramos una gran proporción (75%), con mutación en el codón 235, (A235A) que es una mutación sinónima. Además de la mutación en 235, 20 aislamientos presentaron una o varias mutaciones en otros codones que deben estudiarse más profundamente para confirmar si existe asociación verdadera con la resistencia a kanamicina, amikacina o capreomicina.

En el gen *rrs* se encontró alta frecuencia (33%) de los aislamientos con mutaciones en el codón 467, presentando 8 genotipos diferentes, previamente reportado en algunos estudios como fuertemente implicado en resistencia a kanamicina, amikacina o capreomicina pero no en otros estudios. La variabilidad de los reporte podría explicarse por la presencia de diferentes genotipos en los cuales 4 son mutaciones no sinónimas y 3 dan codón de parada, existiendo una mutación sinónima. Nuestro hallazgo de mutaciones en otros codones diferentes al 467, requiere más estudios para confirmar su relevancia en la detección de aislamientos XDR.

El gran número de aislamientos analizados en el presente estudio permiten asegurar que existe una fuerte asociación entre las mutaciones detectadas en los genes *rpoB* y *katG* con la resistencia a medicamentos de primera línea rifampicina e isoniazida respectivamente mientras que simultáneamente podemos afirmar que las mutaciones en *inhA* y *ahpC* no están fuertemente asociadas con resistencia a isoniazida en los aislamientos colombianos.

Por otra parte, a partir de este estudio podríamos contar con dos blancos moleculares ampliamente útiles en la detección de aislamientos XDR como son *gyrA*, *rrs* y además un blanco posiblemente útil para este efecto como sería *tlyA*.

De lo detectado en el estudio de *gyrA*, *tlyA* y *rrs*, se concluye que la presencia de aislamientos XDR, entre los MDR, no sobrepasa el 12%, lo cual es alentador en el sentido de que la MDR en Colombia se encuentra alrededor del 5% y por lo tanto la XDR no alcanzaría a llegar al 1%.

En conclusión, en el presente trabajo se ha generado nuevo conocimiento científico, describiendo por primera vez las mutaciones identificadas en un número significativo de aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* MDR/XDR, que confieren resistencia a los medicamentos de primera y segunda línea, lo cual servirá como insumo para el desarrollo de metodologías moleculares rápidas y adecuadas, útiles en la detección de tales aislamientos.

Palabras Clave

1. Tuberculosis (TB), 2. tuberculosis multidrogorresistente (TBMDR), 3. tuberculosis extremadamente resistente (TBXDR), 4. reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 5. mutaciones puntuales, 6. secuenciación

II Abstract

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*, which was declared in 1993 by the World Health Organization (WHO) as a global health emergency, since efforts to control the disease have not stopped and different strategies have been designed to combat it, but their control appears to be increasingly distant with the emergence of resistance to various anti-TB drugs used to combat *M. tuberculosis*. In this situation the multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is apparent, which is resistant to at least two of the main drugs used in treatment such as: rifampicin and isoniazid. Which can become extremely resistant tuberculosis (XDR-TB), where there is also resistance to fluoroquinolones and second-line injectable (capreomycin / kanamycin / amikacin).

In order to identify and describe for the first time in the country the mutations associated with resistance to TB drugs, present in specific of each of the seven selected molecular targets regions, were taken from the biobank, isolates collected in the past 10 years: 130 MDR isolates and 30 susceptible isolates to first-line drugs, along with ATCC strains as control; to which had been previously classified by the reference method of Multiple Proportions, used to determine the susceptibility to TB drugs also previously undergone by genotyping by spoligotyping.

Recovery of isolates in liquid medium was carried out in order to obtain a considerable bacillary biomass for subsequent extraction of the DNA and evaluation of its quality, with quantified correctly. Seven pairs of primers for amplification of the seven molecular amplified targets were designed: *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *gyrA*, *rrs*, and *tlyA*, which were selected to provide information about drug resistance and that contribute to the detection of MDR isolates and XDR. Standardizing the reactions performed in polymerase chain (PCR) for amplification of the seven molecularly selected for a total of 1120 products. Amplified products were purified, for automatic sequencing through PRISMA® ABI 3100 Genetic Analyzer Applied Biosystems, USA. The results of this sequencing were analyzed using Applied Biosystems SeqScape v.3.0 software designed for the detection, analysis and confirmation of mutations.

In *rpoB* gene Colombian isolates MDR find mutations already described in similar proportions to those reported being S531L, the most common and also found six mutations not previously reported (D435V, V477M, E588K, S600T, I603S, V662F) which could confer resistance to rifampicin because despite being out of RRDR region are not synonymous nor were found combined with other already reported to cause resistance to rifampicin.

Among the 130 MDR isolates, 44.6% had the S315T mutation in the *katG* gene mutation that has been reported to occur at different rates in different countries and on the other hand, we find other mutations at codon 315 (S315N, S315I) and furthermore, 28% of these MDR isolates carry mutations in different codons to 315, which also go unnoticed by commercial methods. The 9.2% and 22.9% of the isolates do not have mutations in the *katG* and in *rpoB* respectively.

Regarding the study of the molecular targets for detection of resistance to second-line drugs: *gyrA*, *rrs* and *tlyA*, our results are the first to be performed with isolates from around the country and the only one with a substantial number of MDR isolates, therefore are of great value in the context of public health and drug resistance.

In the *gyrA* gene, a high proportion (94%) of isolates with the S95T mutation was found; this mutation has been reported in isolates from Venezuela and China and not associated with resistance to fluoroquinolones. The mutation at codon 94, strongly associated with fluoroquinolone resistance, because only one is exotic introduced isolation but instead detected three hot spots for mutations in all the isolates.

Given that mutations in fluoroquinolone resistance in MDR isolates, are markers of pre-TB isolates, our findings in *gyrA* (12.8% mutations), loom large in the national context, and therefore should be monitored and studied more deeply.

The *tlyA* and *rrs* genes have been less studied than *gyrA* therefore our findings are novel and allow ratify it takes to perform more studies to elucidate its actual contribution in the detection of XDR isolates.

For *tlyA* gene in all the isolates found a large proportion (75%) with mutation at codon 235 (A235A) is a synonymous mutation. In addition to the mutation at 235, 20 isolates had one or more mutations in other codons to be studied further to confirm whether there is a real association with resistance to kanamycin, amikacin or capreomycin.

In *rrs* gene, a high frequency (33%) isolates with mutations in codon 467 was found, presenting 8 different genotypes previously reported in some studies to be strongly implicated in resistance to kanamycin, amikacin or capreomycin but not in other studies. The variability of the report could be explained by the presence of different genotypes in which 4 are non-synonymous mutations and 3 give stop codon, a synonymous mutation exist. Our finding of mutations in codons other than the 467, requires further studies to confirm its significance in the detection of XDR isolates.

The large number of isolates analyzed in this study allow us to ensure that there is a strong association between the mutations detected in the *rpoB* and *katG* genes with resistance to rifampicin and isoniazid first line drugs respectively while simultaneously it was found that mutations in *inhA* and *ahpC* are not strongly associated with isoniazid resistance in Colombian isolates.

Moreover, from this study we could have two molecularly targets widely useful in detecting isolates XDR like *gyrA*, *rrs* useful for this purpose and possibly plus *tlyA*.

By showed in the *gyrA*, *tlyA* and *rrs* study, it is concluded that the presence of isolates XDR among MDR does not exceed 12%, which is encouraging in the sense that the MDR in Colombia is about 5% and thus the XDR not reach more than 1%.

In conclusion, this work has generated new scientific knowledge, describing first the mutations identified in a significant number of Colombian isolates of *Mycobacterium tuberculosis* MDR / XDR, which confer resistance to drugs of first and second line, which will as input for the development of rapid and appropriate, useful in detecting molecular methodologies such isolates.

Keywords

Tuberculosis (TB), tuberculosis multidrogresistente (TBMDR), tuberculosis extremadamente resistencia (TBXDR), mutation

TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción	19
2	Planteamiento del problema y justificación	21
2.1	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	21
3	Marco Teórico	22
3.1	Taxonomía de <i>M. tuberculosis</i>	22
3.2	Características generales.....	22
3.3	Características moleculares.....	23
3.4	Fisiopatología de la tuberculosis	23
3.5	Diagnóstico de la tuberculosis	24
3.6	Tratamiento de la tuberculosis	25
3.7	Epidemiología molecular.....	26
3.8	Tipificación de oligonucleótidos espaciadores (Spoligotyping)	26
3.9	Resistencia de <i>M.tuberculosis</i> a los antibióticos.....	27
3.9.1	Rifampicina.....	27
3.9.2	Isoniazida.....	28
3.9.3	Fluoroquinolonas	29
3.9.4	Aminoglucósidos	30
4	Objetivos	31
4.1	Objetivo General	31
4.2	Objetivos específicos:.....	31
5	Materiales y Métodos	32
5.1	Aislamientos Clínicos.....	32
5.2	Cultivo de los aislamientos clínicos	32
5.3	Extracción de ADN de los aislamientos clínicos	32
5.4	Cuantificación del ADN.....	33
5.5	Diseño de los iniciadores.....	33
5.6	Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para los blancos moleculares	34
5.7	Amplificación y electroforesis para evidenciar los productos de PCR	35
5.8	Purificación de los amplificados de cada gen.....	35
5.9	Cuantificación de la concentración de los productos de amplificación.....	36

5.10	Secuenciación.....	37
5.10.1	Análisis de las secuencias	38
6	RESULTADOS	39
6.1	Distribución geográfica de los aislamientos incluidos en el estudio.....	39
6.2	Distribución genotípica de los aislamientos incluidos en el estudio, basada en spoligotyping	41
6.3	Resultados de la cuantificación del ADN.....	43
6.4	Diseño de iniciadores y sondas	44
6.6	Resultados de la estandarización de las reacción en cadena de la polimerasa para los blancos moleculares.....	45
6.7	Resultados de la amplificación y electroforesis de los productos de PCR	46
6.8	Cuantificación de los productos purificados	47
6.9	Resultados de secuenciación	47
6.9.1	Secuenciación del fragmento de 616 pb del gen <i>rpoB</i>	48
6.9.2	Secuenciación del fragmento de 1516 pb del gen <i>katG</i>	51
6.9.3	Secuenciación del fragmento de 765 pb del gen <i>inhA</i>	54
6.9.4	Secuenciación del fragmento de 490 pb del gen <i>ahpC</i>	55
6.9.5	Secuenciación del fragmento de 322 pb del gen <i>gyrA</i>	57
6.9.6	Secuenciación del fragmento de 789 pb del gen <i>tlyA</i>	60
6.9.7	Secuenciación del fragmento de 1404 pb del gen <i>rrs</i>	62
6.10	Resultados de la secuenciación en relación con los espoligotipos.	64
6.10.1	Familia Beijing	64
6.10.2	Familia LAM	65
6.10.3	Familia Haarlem.....	65
6.10.4	Familia U.....	65
6.10.5	Espoligotipos no reportados (huérfano)	65
6.11	Distribución de los aislamientos con fenotipo sensible o resistente a los medicamentos según la presencia o ausencia de mutaciones.	66
7	DISCUSIÓN.....	71
8	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	75
9	BIBLIOGRAFIA	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores usados en el estudio con sus concentraciones iniciales y finales.	34
Tabla 2. Origen geográfico de los aislamientos clínicos de <i>mycobacterium tuberculosis</i> incluidos en el estudio.	39
Tabla 3. Descripción de los espoligotipos de aislamientos de <i>m.tuberculosis</i> aislados en Colombia entre 1999-2009, incluidos en el estudio.	41
Tabla 4. Características de los iniciadores diseñados para el estudio.	44
Tabla 5. Concentraciones y volúmenes finales estandarizados para los siete blancos moleculares.	45
Tabla 6. Eficiencia obtenida en la secuenciación de los siete blancos moleculares estudiados.	47
Tabla 7. Distribución de las mutaciones en el gen <i>rpoB</i> de los 160 aislamientos clínicos de <i>m. tuberculosis</i> estudiados (130 con fenotipo <i>mdr</i> y 30 con fenotipo susceptible).	49
Tabla 8. Distribución de las mutaciones en el gen <i>katG</i> de los 160 aislamientos clínicos de <i>m tuberculosis</i> estudiados (130 con fenotipo <i>mdr</i> y 30 con fenotipo susceptible).	52
Tabla 9. Distribución de las mutaciones en el gen <i>inhA</i> de los 160 aislamientos clínicos de <i>m. tuberculosis</i> estudiados (130 con fenotipo <i>mdr</i> y 30 con fenotipo susceptible).	55
Tabla 10. Distribución de las mutaciones en el gen <i>ahpC</i> de los 160 aislamientos clínicos de <i>m tuberculosis</i> estudiados (130 con fenotipo <i>mdr</i> y 30 con fenotipo susceptible).	56
Tabla 11. Distribución de las mutaciones en el gen <i>gyrA</i> de los 160 aislamientos clínicos de <i>m tuberculosis</i> estudiados (130 con fenotipo <i>mdr</i> y 30 con fenotipo susceptible).	58
Tabla 12. Distribución de las mutaciones en el gen <i>tlyA</i> , de los 160 aislamientos clínicos de <i>m. tuberculosis</i> estudiados (130 con fenotipo <i>mdr</i> y 30 con fenotipo susceptibles).	61
Tabla 13. Distribución de las mutaciones en el gen <i>rrs</i> , de los 160 aislamientos clínicos de <i>m. tuberculosis</i> estudiados (130 con fenotipo <i>mdr</i> y 30 con fenotipo susceptible)	63
Tabla 14. Distribución de los aislamientos estudiados estratificados según fenotipo de resistencia a los medicamentos y presencia de mutaciones.	66
Tabla 15. Descripción de las mutaciones predictoras de fenotipos <i>mdr</i> entre los aislamientos colombianos.	68
Tabla 16. Descripción de las mutaciones predictoras de fenotipos <i>xdr</i> entre los aislamientos colombianos.	69
Tabla 17. Mutaciones más frecuentes asociadas con resistencia a medicamentos en <i>m, tuberculosis</i> , basada en la información del <i>tbdreamdb</i> (http://www.tbdreamdb.com)	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cuantificación del ADN de uno de los aislamientos, por espectrofotometría.

Figura 2. Distribución de la procedencia de los aislamientos estudiados según su fenotipo de susceptibilidad a los medicamentos.

Figura 3. Análisis filogenético de los aislamientos incluidos en el estudio según su espoligotipo.

Figura 4. Cuantificación del ADN utilizado como referencia.

Figura 4A 4B Cuantificación de la calidad y cantidad de los ADN extraídos a partir de los aislamientos clínicos.

Figura 5. Productos de amplificación de los 7 blancos moleculares estudiados.

Figura 6. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *rpoB*.

Figura 7. Alineamiento de algunos aislamientos colombianos con genotipo resistente a rifampicina, mostrando las mutaciones del gen *rpoB*, en codones, corriente abajo del RRDR, diferentes a los reportados previamente.

Figura 8. Alineamiento de algunos aislamientos colombianos con genotipo resistente a rifampicina, mostrando las mutaciones del gen *rpoB*, en codones, corriente arriba del RRDR, diferentes a los reportados previamente.

Figura 9. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *katG*.

Figura 10. Alineamiento de algunos aislamientos colombianos con genotipo resistente a isoniazida, mostrando las mutaciones en el codón 315 del gen *katG*.

Figura 11. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *inhA*.

Figura 12. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *ahpC*.

Figura 13. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *gyrA*.

Figura 14. Presencia de tres sitios calientes para mutaciones en el gen *gyrA* encontradas en los aislamientos colombianos estudiados.

Figura 15. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *tlyA*.

Figura 16. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *rrs*.

Figura 17. Mutaciones en *katG* de los aislamientos Beijing

Figura 18. Evidencia de mutaciones en el gen *gyrA* de los aislamientos Beijing colombianos.

LISTA DE ANEXOS

- A. **Anexo:** Base de datos con los 160 aislamientos y los resultados obtenidos de estos, por el método de proporciones múltiples a los medicamentos de primera línea y spoligotyping
- B. **Anexo:** Resultados del diseño de los iniciadores para la amplificación de los siete blancos moleculares.
- C. **Anexo:** Protocolo de la estandarización de cada PCR, para la amplificación de los blancos moleculares.
- D. **Anexo:** Resultados de las amplificaciones para los 7 blancos moleculares a los 160 aislamientos.
- E. **Anexo:** Protocolo de purificación de los productos de PCR.
- F. **Anexo:** Resultados de las secuenciaciones de los 160 aislamientos, para los siete blancos moleculares.
- G. **Anexo:** Resultados de la base de datos de los marcadores moleculares usados para el de redes.
- H. **Anexo:** Concentración de los productos amplificados que fueron purificados de cada uno de los blancos moleculares.

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
A	Adenina
AMK	Amikacina
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADR	Reacción adversa a las drogas
AFB	Bacilo acido alcohol resistente
AIDS	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
DMSO	Di-metil-sulfóxido
dNTP's	Desoxirribunucleotidos trifosfato
DST	Test de susceptibilidad a drogas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
TB	Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculosis multidrogorresistente
TB-XDR	Tuberculosis extensivamente drogo resistente
TB-TDR	Tuberculosis totalmente resistente
SHRE	Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol
ATCC	Colección de cultivos tipo americana
DOTS	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
LJ	Löwestein Jensen
MSTA	Medio Sauton Tween Albumina Modificado

Abreviatura	Término
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de Salud
OPS	Organización Panamericana de Salud
RIF	rifampicina
S	estreptomina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
FQ	fluoroquinolonas
G	Guanina
INH	Isoniazida
KAM	Kanamicina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RIF	Rifampicina
rRNA	RNA ribosomal
T	Timina
TE	Tris –EDTA
Tm	Temperatura de anillaje
HIV	Virus inmunodeficiencia humana
CMP	Capreomicina
C	Citosina
MPM	Método de Proporciones Múltiples

1 INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa, causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* y es la segunda causa de mortalidad mundial producida por un agente infeccioso, después del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Según el último reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el 2012 se estimó que 8.6 millones de personas desarrollaron TB y 1.3 millones fallecieron por causa de la enfermedad, incluyendo 320.000 muertes de personas VIH positivo que tenían infección TB-VIH (1). Esta enfermedad se transmite de persona a persona a través del aire, afectando principalmente el sistema respiratorio, pero puede llegar a afectar otros órganos, la transmisión ocurre normalmente cuando un enfermo de tuberculosis pulmonar tose, estornuda o escupe, expulsando bacilos tuberculosos al aire y basta con que una persona inhale unos pocos bacilos para quedar infectada, por lo cual se calcula que una tercera parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis*, es decir, están contagiadas por el bacilo pero aún no han desarrollado la enfermedad ni pueden transmitirla a otras personas, conocida como tuberculosis latente, teniendo claro que el desarrollo de esta va a depender del estado en que se encuentre el sistema inmune del hospedero (2).

Aunque se dispone de medicamentos antituberculosos desde hace más de 50 años, se ha observado un aumento en el número de casos resistentes a por lo menos dos de los principales medicamentos usados en el tratamiento de la TB, como son la isoniazida (INH) y rifampicina (RIF), describiéndose estos aislamientos como tuberculosis multidrogorresistentes (TB-MDR), La cual puede llegar a convertirse en tuberculosis extensivamente drogoresistente (TB-XDR), cuando además hay resistencia a una fluoroquinolona y uno de los antibióticos inyectable de segunda línea como (kanamicina/amikacina/capreomicina). Esta situación hace aún más complejo, prolongado y costoso el tratamiento antituberculoso (3).

En Colombia, la tasa de multirresistencia observada en estudios nacionales aumentó de 1,5% (1999-2002) a 2,4% (2004-2005) (4). Pese a contar con estos estudios de resistencia fenotípica, no se cuenta con información suficiente de las mutaciones asociadas con TB-MDR/TB-XDR en el país, aunque a nivel mundial ya han sido descritas por diferentes países (5-7), cabe destacar que se han demostrado variaciones entre aislamientos de diferentes regiones geográficas, lo que hace indispensable caracterizar los aislamientos resistentes circulantes en el país, con el fin de identificar mutaciones ya sea similares a las reportadas o propias de los aislamientos colombianos, cuya detección posibilite el diagnóstico temprano de resistencia a los diferentes medicamentos, lo cual contribuirá a optimizar la quimioterapia y consecuentemente disminuir la transmisión de cepas resistentes.

Partiendo del conocimiento generado, de la secuenciación completa del genoma de *M. tuberculosis* (8,9), se incrementó el entendimiento sobre los principales mecanismos de resistencia presentes para los medicamentos antituberculosos, observando mutaciones puntuales en genes específicos, asociadas con una alta resistencia a los medicamentos antituberculosos.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio es detectar y describir las mutaciones propias, presentes en 130 aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* clasificados fenotípicamente como MDR, recolectados en los últimos 10 años (1999-2010), secuenciando 7 blancos moleculares: *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *tlyA*, *rrs* y *gyrA*, cada uno de los cuales ha sido asociado con resistencia a los medicamentos antituberculosos.

La resistencia a los medicamentos generalmente está determinada por mutaciones específicas en el genoma de *M. tuberculosis*, que se asocian con isoniazida especialmente en los genes *katG* (del 36 al 97%), *ahpC* (del 0 a 23,8%) e *inhA* y *oxyR* en baja proporción. Con rifampicina se asocia con mutaciones en el gen *rpoβ* (del 83 al 100%); con fluoroquinolonas en el gen *gyrA* (del 75 al 94%), con aminoglicósidos en el gen *rrs* (de 0 al 92%) y para capreomicina en el gen *tlyA*, donde existen pocos reportes (10).

Considerando el gran significado de esta investigación, por la generación de nuevo conocimiento, basado en las mutaciones propias encontradas para cada uno de los 7 genes constitutivos estudiados en los aislamientos colombianos, se podrá desarrollar a futuro una metodología molecular rápida, robusta y económica que facilite el diagnóstico de tuberculosis MDR/XDR.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Se han observado grandes cambios en la historia del tratamiento de la tuberculosis desde la introducción del primer antibiótico con actividad antimicobacterial, como fue la Estreptomina (S) (11), usado inicialmente como monoterapia, seguido de otros medicamentos con igual actividad hasta llegar al actual tratamiento: Estreptomina, Isoniazida, Rifampicina y Etambutol (SHRE) los cuales se administra simultáneamente como una multiterapia efectiva. Esta ha contribuido a la disponibilidad de un tratamiento más corto que garantiza la curación si es administrado correctamente, logrando interrumpir la cadena de transmisión de la enfermedad. Sin embargo, la aparición de la resistencia adquirida a estos medicamentos es un problema de salud pública que se ha observado viene en aumento en los últimos años (1).

Se han reportado estudios a nivel mundial, que comprueban la existencia de cepas del bacilo que presentan resistencia a por lo menos un medicamento antituberculoso, teniendo en cuenta que esta problemática se agudiza aún más en los países en vía de desarrollo donde son varios los factores que están implicados en el aumento de la resistencia por la falta de vigilancia y control por parte de los programas de control de tuberculosis, así como el aumento de la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), lo cual vuelve aún más difícil y costoso el control de la enfermedad unido a la falta de financiación para realizar investigaciones con el fin de aumentar el conocimiento sobre la misma (3).

Ya que a nivel mundial para algunos países han sido descritas las mutaciones asociadas con resistencia a los medicamentos antituberculosos de primera y segunda línea (10).y teniendo en cuenta que pueden presentarse variaciones entre aislamientos de diferentes regiones geográficas, con mutaciones propias en cada país, relacionadas con las condiciones de sus esquemas de tratamiento e implementación de este y a los programas de vacunación establecidos, también a la calidad de los medicamentos usados, es importante conocer las mutaciones propias del país, con el fin de identificar y describir cuales mutaciones pueden estar asociadas con resistencia a los medicamentos antituberculosos de primera y segunda línea para contribuir en el futuro al desarrollo de metodologías moleculares rápidas, que permitan captar los aislamientos MDR/XDR que circulan en el país.

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Por todo lo anterior, nos preguntamos ¿Cuáles son las mutaciones asociadas con tuberculosis MDR y XDR en 7 genes constitutivos para los aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis*?, cuya documentación permitirá, identificar y describir por primera vez, en un número significativo de aislamientos, cuales son las mutaciones que se encuentran circulando en el territorio nacional, teniendo en cuenta que este estudio podrá servir como base para el desarrollo de nuevas metodologías moleculares rápidas, robustas y económicas que faciliten un diagnóstico oportuno y por lo tanto un acceso adecuado al tratamiento.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Taxonomía de *M. tuberculosis*

Las micobacterias se adscriben taxonómicamente al phylum ***Actinobacteria***, orden ***Actinomycetales***, familia ***Mycobacteriaceae***, con un único género ***Mycobacterium***, los cuales se caracterizan por ser bacilos aerobios gram positivos, donde se encuentran además, la familia ***Corynebacteriaceae*** y las ***Nocardioformes*** (con los géneros ***Nocardia*** y ***Rhodococcus***)(12).

El género *Mycobacterium* contiene más de 140 especies (12) y a su vez este género se divide en tres grandes grupos el primero, el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, que se encuentra conformado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. cannetii*, *M. pinnipedii* y *M. mungi*, todos ellos comparten un 99,95% de identidad a nivel de ADN pero poseen una amplia variabilidad en cuanto a sus hospederos, tipo de patología y severidad de la enfermedad, siendo el de mayor importancia el *Mycobacterium tuberculosis*, patógeno obligado en humanos donde causa la tuberculosis(13).

El segundo grupo conformado por *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium lepraemurinum*, causantes de lepra en el hombre y en el ratón respectivamente y un tercer grupo se refiere a las Micobacterias no Tuberculosas (MNT), que son organismos saprofitos, los cuales se pueden aislar fácilmente del medio ambiente, incluyendo sistemas de agua artificial (14) y que tienen la capacidad de causar enfermedad oportunista en humanos y en diferentes animales domésticos y salvajes (15).

3.2 Características generales

El *Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo curvo de 3 a 5 µm de longitud, no móvil, no esporulado, aerobio estricto, se caracteriza por ser ácido-alcohol resistente ya que presenta resistencia a la decoloración con alcohol ácido al 3% durante la tinción de Ziehl-Neelsen; tiene una velocidad de crecimiento mucho más lenta comparado con otras bacterias, pues su tiempo de generación es de 18 horas por lo que necesita de 3-4 semanas de incubación a 37°C para poder observar colonias macroscópicamente visibles (16).

Posee una membrana plasmática cubierta con una pared celular compuesta por múltiples capas, de aproximadamente 20nm de espesor, siendo una pared compleja y muy diferente a las que presentan las bacterias grampositivas y gramnegativas. Contiene cadenas de polisacáridos muy similares a las bacterias gramnegativas, lípidos externos, lípidos complejos algunos de los cuales son exclusivos de las micobacterias y presenta una capa de peptidoglicano, arabinogalactano (complejo

de polisacáridos unidos covalentemente al peptidoglicano, formado por unidades de arabinosa y galactosa) y ácidos micólicos que conforman la pared que normalmente tiene entre 70-90 carbonos, siendo estos el 40% de los lípidos lo cual le confiere la hidrofobicidad en la parte externa y la convierte en una pared rígida de alta complejidad, que hace que los solventes hidrófilos y antibióticos tengan poca penetración al interior de la bacteria (17-19)

3.3 Características moleculares

Gracias a que se cuenta con la secuenciación completa de la cepa de referencia H37Rv desde 1998 (8), se sabe que contiene 4.411.529 pb y cuenta con 4048 marcos abiertos de lectura y 3924 genes que codifican para proteínas, de los cuales 90 genes codifican para virulencia, decodificación y adaptación, 233 genes para el metabolismo de lípidos, 229 genes para las vías de información, 708 genes para la pared celular y procesos celulares, 50 genes para RNA estables, 149 genes codifican para secuencias de inserción, 170 genes para proteínas PE, PEE, 894 genes codifican para intermediarios del metabolismo y respiración, 272 genes para proteínas de función no conocida, 189 genes para proteínas reguladoras, 1051 genes corresponden a proteínas de función desconocida o hipotéticamente conservadas (9).

Se caracteriza por tener un alto contenido guanina-citosina en su genoma entre el 60-70%, además contiene una larga cadena de peptidoglicano la cual es usualmente muy rica en lípidos, glicolípidos y polisacáridos (20) y se conocen aproximadamente 250 enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos comparado con los 50 descritos para *E. coli* (21).

3.4 Fisiopatología de la tuberculosis

La transmisión ocurre normalmente por las vías respiratorias, al inhalar los bacilos de *M. tuberculosis* a través de las gotitas infecciosas de pacientes con tuberculosis activa, se estima que entre 5 a 200 bacilos se pueden inhalar, la mayoría pueden quedar atrapados en las vías superiores y expulsados por el barrido ciliar de las células de la mucosa, pero solo el 10% de ellos puede llegar hasta los alvéolos, al encontrarse el bacilo tuberculoso en el alveolo en una persona sin contacto previo, son fagocitados inespecíficamente por los macrófagos alveolares no activados, una vez dentro del macrófago suelen multiplicarse lentamente dentro del macrófago, dando lugar a una inflamación con abundante fibrina, macrófagos y algunos polimorfonucleares, produciendo la liberación de citoquinas, que a su vez atraerán más macrófagos y monocitos para fagocitar los bacilos (22). Entre los días 7-21 se produce la acumulación de bacilos intracelulares y monocitos, lo que va a llevar a la formación del granuloma, para una posterior necrosis tisular, lo que hace que se cree un ambiente desfavorable para la multiplicación del bacilo, pero el riesgo de que el bacilo se disemine ocurre ya que los macrófagos alveolares pueden alcanzar la vía linfática y desde ahí la diseminación vía hematogena al resto del organismo, especialmente a órganos donde la presión de oxígeno es alta y favorable al crecimiento de las micobacterias, como los vértices pulmonares, riñones, ganglios suprarrenales, epífisis y metáfisis de los huesos largos (23). En estas zonas se

producen focos de multiplicación (granulomas) y presentan necrosis gaseosa, hasta la 2-10 semanas donde se detiene la multiplicación del bacilo por parte del sistema inmune (primoinfección). En la mayoría de los casos ni el complejo primario, ni la diseminación hematológica, ni otra de las posibles localizaciones causan enfermedad aparente, sino que serán otras formas subclínicas, lo que indica que la enfermedad puede progresar rápidamente, reactivarse años después o nunca, se calcula que solo alrededor del 10% de las personas infectadas podrán padecer la enfermedad (24).

Una vez se produce la infección pueden evolucionar de las siguientes maneras:

- La infección se resuelva por si misma a través de los macrófagos
- Dentro de las siguientes semanas o meses se desarrolle una tuberculosis activa
- Que la infección se mantenga asintomática por un largo tiempo (latente), y se active en cualquier momento por la deficiencia del sistema inmune, ya sea por la edad o consecuencia de otras enfermedades, especialmente VIH (22).

Una vez se desarrollen sus manifestaciones clínicas, que se caracterizan normalmente por síntomas como: sudoración nocturna (diaforesis), pérdida de peso inexplicable, tos con expectoración por más de 15 días, siendo estos algunos de los principales síntomas. En algunos casos no se presentaran los anteriores síntomas y estos van a depender del foco o localización de la infección y del sistema inmune del hospedero (2).

3.5 Diagnóstico de la tuberculosis

El diagnóstico de la tuberculosis pulmonar o extrapulmonar, se realiza inicialmente por la observación microscópica del bacilo ácido alcohol resistente, previa realización de la coloración de Zielh Neelsen en muestra de esputo o cualquier otro tipo de muestras. Además se puede acompañar de la observación de lesiones en la radiografía de tórax, o de la observación macroscópica de colonias en medios de cultivo sólido o líquido, que pueden realizarse por medio de equipos automatizados, los cuales son capaces de detectar la fluorescencia que emiten el medio cuando hay crecimiento del *M. tuberculosis*.

El cultivo es la prueba estándar para el diagnóstico de la tuberculosis, el cual se puede realizar tanto en medios líquidos como el Middlebrook o en medios sólidos como el Löwestein-Jensen (LJ) en el cual se podrá observar crecimiento bacteriano entre la 4 a 6 semana por el lento ciclo de replicación de la bacteria. Este tiempo se ha reducido desde la utilización de los medios de cultivo líquido los cuales tardan entre 7 a 12 días (25), disminuyendo el tiempo de detección pero con la desventaja, de un mayor riesgo de contaminación; en general estas técnicas tienen un límite de detección muy bajo, que por lo general subestiman la mitad de los casos (26).

Actualmente el uso de métodos moleculares, que se basan en la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), de una región específica del genoma. La prueba gold estándar para estas metodologías es la secuenciación que permite obtener directamente la secuencia de nucleótidos de la región de interés que se esté analizando y comparar esta con las secuencias de referencia ya reportadas en las bases de datos, con el fin de lograr la identificación del microorganismo presente, permitiendo identificar la presencia de alguna micobacteria y además diferenciar entre el complejo *M.tuberculosis* y las micobacterias no tuberculosas, especialmente en muestras clínicas que no crecen lo suficientemente rápido (27).

Recientemente el uso de métodos moleculares ha logrado acortar los tiempos en la identificación del bacilo e identificar mutaciones a las cuales se les ha determinado Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) altas, asociándolas con resistencia a los medicamentos antituberculosos, siendo los métodos moleculares más sensibles y específicos comparados con los métodos fenotípicos, sin embargo pueden tener un costo adicional debido a los altos requerimientos técnicos y personal altamente calificado para realizar estas metodologías (28).

3.6 Tratamiento de la tuberculosis

El uso de medicamento contra la tuberculosis ha cambiado a través del tiempo, desde su inicio hace más de 70 años, con una monoterapia, hasta lo que hoy en día se conoce como poliquimioterapia, la cual consta de la administración de varios medicamentos simultáneamente, los cuales han sido clasificados en dos grupos de acuerdo a su eficacia, potencia y efectos secundarios. Existen los medicamentos de primera línea que se consideran los más eficaces como son la rifampicina (RIF), la isoniazida (INH), la pirazinamida (PZA) y el etambutol (ETH) y los medicamentos de segunda línea menos bactericidas y con más efectos secundarios que los primeros, como son las fluoroquinolonas (FQ) y los inyectables como la capreomicina (CAP), la kanamicina (KAN) y la amikacina (AMK). Este tratamiento es muy eficaz, asumiendo que los bacilos sean sensibles a los medicamentos y que su administración sea correcta y por el tiempo requerido, para que pueda curar el 100% de los casos de tuberculosis (29).

Actualmente, el tratamiento en Colombia emplea cuatro bactericidas, y la duración mínima necesaria es de 6 meses, la cual se divide en dos fases, la primera de ellas consisten en la administración de cuatro bactericidas durante 2 meses, seguido de una fase de estabilización por 4 meses con INH+RIF a dosis fija. Existe evidencia científica que demuestra que la curación es del 99% de los casos usando este tratamiento y que evita la recaída en el 97% de ellos (30,31).

Es fundamental que las personas que padecen la enfermedad finalicen sus esquemas de tratamiento con rigurosidad, ya que si el tratamiento se interrumpe, puede haber un incremento de la población bacilar donde los bacilos que permanecen vivos se seleccionaran y se volverán resistentes a los medicamentos, con la posibilidad de convertirse en tuberculosis MDR en la cual se presenta resistencia a INH y RIF, lo cual cambia totalmente el panorama del tratamiento, puesto que se debe hacer uso de los medicamentos de segunda línea, los cuales deben ser manejados por expertos y lo ideal es conocer los medicamentos que anteriormente ha tomado, para de esta manera instaurar el

nuevo tratamiento, administrando por lo menos tres nuevos fármacos, incluyendo un aminoglucósido inyectable, una quinolona y un antibiótico oral tipo etionamida; si antes no lo ha recibido, de lo contrario incluir pirazinamida o etambutol (30,31).

3.7 Epidemiología molecular

Se sabe que un método de tipificación molecular debe ser rápido y sencillo de realizar, no debe ser costoso y fácilmente aplicable sobre material clínico o que no requiera una gran cantidad de bacterias en cultivo, preferiblemente que tenga un buen poder para discriminar o diferenciar cepas y que los marcadores genéticos sean estables (32).

El desarrollo de herramientas útiles para realizar epidemiología molecular en tuberculosis, ha permitido tener un mejor entendimiento de la enfermedad, con la ayuda de metodologías como: *spoligotyping*, Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadoras-Número variable en Tamden (MIRU) y la tipificación por Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), las cuales han servido como una herramienta básica para lograr entender la diversidad genética en la población de bacilos del complejo *M. tuberculosis*. Dichas metodologías han permitido caracterizar brotes, facilitando la comparación de las cepas circulantes en diferentes poblaciones, con el objetivo de identificar las posibles cadenas de transmisión de la infección (32,33).

Además, de acuerdo con la caracterización de su huella genética, permite distinguir entre una bacteria y otra, facilitando el análisis de la situación de la enfermedad, frente a la cual se encuentra el clínico: reactivación, reinfección, infección latente o transmisión reciente, lo cual es de gran importancia epidemiológica y clínica, para la instauración del tratamiento adecuado (32).

3.8 Tipificación de oligonucleótidos espaciadores (Spoligotyping)

Es uno de los métodos que se usan con mayor frecuencia, para realizar estudios filogeográficos del complejo *M. tuberculosis*, ya que permite identificar las diferentes especies del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. microtti*, *M. bovis*, *M. africanum*), basándose en los polimorfismos de una región particular llamada locus de repetición directa (DR), que es una región conservada de 36 pb (DRs) y entre una y otra de estas regiones se encuentran las regiones espaciadoras no repetidas o conformadas entre fragmentos 34-41 pb. Se han descrito 94 espaciadores, pero solo 43 de ellos son utilizados rutinariamente para la genotipificación (34). Para la realización de esta metodología se hace la amplificación de todo el locus DR mediante PCR, y el producto de esta amplificación se hibrida sobre una membrana que posee sondas dirigidas contra los diferentes espaciadores, como resultado se obtienen patrones correspondientes a las diferentes familias o linajes integrantes del complejo *M. tuberculosis*: LAM, CAS, Haarlem, Beijing, X, T, U, S, cuya identificación se encuentra registrada en la base de datos SpolDB4 (35). Este método es ampliamente usado ya que facilita la comparación de resultados entre laboratorios siendo muy reproducible y utilizado comúnmente para realizar análisis filogenéticos (36).

3.9 Resistencia de *M.tuberculosis* a los antibióticos

El mayor avance en biología molecular, se ha logrado a través de la secuenciación completa del genoma de *M. tuberculosis*, publicada por primera vez en 1998, gracias al trabajo interdisciplinario de varios grupos de investigación, con el fin de tener una mejor comprensión de la biología de este patógeno (8). Posteriormente se realizó una re-anotación en las secuencias del genoma de *M. tuberculosis* en 2002, la cual se recomienda realizar periódicamente, con el fin de tener información precisa, pertinente y útil (9). El conocimiento generado a partir de estos estudios, contribuyo principalmente a mejorar la comprensión de los mecanismos de resistencia del bacilo frente a los medicamentos usados en el tratamiento contra la tuberculosis.

El *Mycobacterium tuberculosis*, es naturalmente resistente a muchos antibióticos lo que dificulta el tratamiento, esta resistencia es de esperarse principalmente por la alta hidrofobicidad en la pared celular, que actúa como una barrera impermeables a los medicamentos hidrofóbicos (18, 37)

A diferencia de otras bacterias que adquieren resistencia a los medicamentos generalmente por transferencia horizontal o por elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones o integrones, en *M. tuberculosis* la resistencia es causada principalmente por mutaciones espontáneas en genes cromosomales que codifican para blancos moleculares del medicamento. La presencia de mutaciones induce la selección de poblaciones bacilares resistentes a los medicamentos, originadas en la instauración de tratamientos no óptimos, en los cuales hubo interrupción o mala dosificación que se encontraba por debajo de las concentraciones ya establecidas (38).

En procariontes las mutaciones espontáneas ocurren en una tasa baja, de 0.0033 por ciclo de replicación, y esta tasa de mutación es inversamente proporcional al tamaño del genoma de cada bacteria. En estudios previos se ha demostrado que esta tasa de mutación depende de la naturaleza del medicamento. Para muchos de los medicamentos antituberculosos esta tasa es de 10^{-9} , es decir que por cada cien millones de bacterias, puede ocurrir una mutación durante la división celular. Por lo anterior, se requiere utilizar el tratamiento combinado de varios medicamentos, de tal forma que cuando se utilizan por lo menos dos medicamentos antituberculosos la tasa de mutación será aproximadamente de 10^{-18} (38).

Se ha encontrado que las mutaciones neutrales en los genes estructurales de *M. tuberculosis* han disminuido, indicando que la bacteria ha evolucionado recientemente, lo cual está relacionado con su propagación a nivel global (39)

3.9.1 Rifampicina

La rifampicina es un derivado lipofílico de la rifampicina B y uno de los primeros medicamentos usados en el tratamiento de la tuberculosis; su uso inicio en 1972 como un medicamento eficaz por su acción antimicrobiana, siendo unos de los más potentes con actividad bactericida, tanto para los bacilos metabólicamente activos como bacilos en estado de latencia (40).

El blanco genético de la rifampicina en *M.tuberculosis* es la subunidad β de la RNA polimerasa, codificada por el gen *rpo β* (gen de copia única), donde se une e inhibe la elongación del RNA mensajero (41). Este mecanismo de acción se ha logrado determinar mediante cristalografía de rayos X, donde se pudo conocer la estructura de la RNA polimerasa del *M. tuberculosis* y sus interacciones con el sustrato, el ligando y el inhibidor (RIF). Para estas determinaciones se tomó como referencia la RNA polimerasa de *Thermus aquaticus* y se usaron modelamientos estructurales de alta resolución, llegando a la conclusión de que el efecto de la rifampicina sobre RNA polimerasa consiste en bloquear directamente la elongación del transcrito del RNA en su extremo 5' y como resultado inhibir la transcripción produciendo un transcrito de 2 o 3 nucleótidos de longitud (42).

Existe evidencia que la mayoría de aislamientos clínicos fenotípicamente resistentes a rifampicina, poseen mutaciones en el gen *rpo β* , dando como resultado cambios conformacionales que disminuyen la afinidad de unión del medicamento a esta subunidad β . Estas mutaciones ocurren generalmente en una región llamada, Región Determinante de Resistencia a Rifampicina (RRDR), conformada por 81 pb, desde el codón 507 hasta el 533. Se ha publicado que el 96% de los aislamientos fenotípicamente resistentes a rifampicina tienen mutaciones en esta región. Sin embargo existen estudios previos que han reportado mutaciones fuera de esta región (43).

Las mutaciones más frecuentes que se han reportado se encuentran localizadas en los codones 531 y 526, además se ha reportado resistencia cruzada con otras rifamicinas, con mutaciones en algunos codones como 516, 518, 522, 529 y 533, asociadas con bajos niveles de resistencia a rifampicina pero susceptibilidad a rifabutin y rifalzazil (44, 45).

3.9.2 Isoniazida

Poco después de haber iniciado el uso de la rifampicina, se consideró el uso de los dos medicamentos: isoniazida y rifampicina para instaurar un régimen de tratamiento conjugado, con el fin de disminuir un poco la duración de este. La isoniazida se convirtió en uno de los dos principales medicamentos usados en el tratamiento de la tuberculosis. Este medicamento contiene una estructura con anillo de piridina y un grupo hidracida, ambos componentes son esenciales para la actividad contra el *M. tuberculosis* inhibiendo la síntesis de la pared celular.

El *M. tuberculosis* es capaz de aumentar su sistema de defensa antioxidante, lo que le permite al bacilo persistir y multiplicarse en un medio altamente oxidativo como el del macrófago (46), este sistema de defensa se encuentra directamente relacionado con la resistencia a los medicamento y virulencia de esta bacteria, especialmente con la resistencia a INH (47) y a los medicamentos antituberculosos de primera línea, implicados en la inhibición de la síntesis de la pared celular.

La INH es una prodroga que requiere la activación por medio de una enzima peroxidasa, llamada catalasa-peroxidasa, la cual es codificada por el gen *katG* (gen copia única) (48). Como se cree que el producto de esta activación libera el radical acyl isonicotinoil, el cual combinado con NAD⁺/NADH forman el denominado aducto isoniácida-NADH (INH-NADH) (49,50). A pesar de su estructura simple el modo de acción de la isoniazida en aislamientos resistentes, es un proceso complejo, en

el que puedan estar involucrados diferentes genes como *katG*, *ahpC*, *inhA*, *kasA* y *ndh*, asociados con resistencia a INH (51).

La activación de la INH interfiere con la síntesis esencial de los ácidos micólicos por inhibición de NADH-dependiente de enoil-ACP reductasa, la cual es codificada por el gen *inhA* (gen copia única). Mutaciones en el gen *inhA* causan no solo resistencia a INH sino que pueden causar resistencia a etionamida un medicamento antituberculoso de segunda línea por su relación estructural con este (52,53). Los dos mecanismos moleculares descritos anteriormente son la principal causa de resistencia a INH, presentando mutaciones que en *inhA* se encuentran frecuentemente en su región promotora (54).

Estudios realizados por Hazbón *et al* (55), donde analizaron 240 alelos previamente descritos como asociados con resistencia a INH, encontraron que mutaciones en los genes *katG*, *ahpC* e *inhA*, mostraban una fuerte asociación con resistencia a INH, en comparación con mutaciones en *kasA* cuya asociación fue con aislamientos sensibles a INH (55).

Se ha descrito la disminución o pérdida total de la actividad catalasa peroxidasa como resultados de mutaciones en *katG*, la alteración genética más comúnmente asociada con resistencia a INH. Hasta el momento se han reportado más de 100 mutaciones en *katG*, con un rango de CMI entre 0.2-256 mg/L (56).

El gen *ahpC* (gen copia única) que codifica para la enzima *alkil hidropoxidasa reductasa*, es el principal sistema peroxinitrato reductasa, que reduce peróxidos a peroxinitrito y este reduce a *ahpC* y otras proteínas. Se encuentra implicado en la resistencia a INH por sus intermediarios de nitrógeno reactivo y oxígeno reactivo, siendo sus principales mutaciones en la región promotora del gen, sin embargo algunos estudios han encontrado un incremento en la peroxiredoxina de *Mycobacterium tuberculosis*, la cual pertenece a la familia de las peroxidases de peroxirredoxinas ya que se encuentran en muchos organismos vivos como bacterias, plantas, levaduras y trypanosomatidos, son responsables de la defensa antioxidante en estos organismos, especialmente en Micobacterias.(57). *ahpC* no solo detoxifica hidropoxidases sino que permite protección de las células contra agentes reactivos intermediarios del nitrógeno, gracias a su sistema peroxidasa codificado por el gen *ahpC* (58,59). Lo anterior se ha confirmado con estudios donde se han observado, cambios en la expresión de *ahpC* tanto en aislamientos resistentes a INH, como en aislamientos con mutaciones en *KatG*, lo cual confirma que el nivel de expresión de *ahpC* aumenta al parecer como efecto compensatorio de las mutaciones en *katG* que llevan a la deficiencia de la actividad enzimática por parte de la enzima catalasa peroxidasa. La *ahpC* específicamente cataliza la conversión de peroxinitrito (OONO⁻) a nitrito, rápidamente con el fin de evitar la descomposición en radicales como radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno los cuales son dañinos(60).

3.9.3 Fluoroquinolonas

Son unos de los medicamentos usados en el tratamiento de tuberculosis MDR, considerándose así un medicamento de segunda línea, con efecto bactericida. Entre los más usados están la

ciprofloxacina y la ofloxacina, sintéticamente derivados del ácido nalidixico, compuesto descubierto en 1965, producido y purificado como cloroquina medicamento animalario (61).

En *M. tuberculosis*, solo la topoisomerasa tipo II (DNA girasa) representa el único blanco para la actividad de las fluoroquinolonas (62), la topoisomerasa tipo II es un tetrámero compuesto por dos subunidades A y B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* (genes copia única) respectivamente, teniendo como función el desenrollamiento del DNA, el cual es fundamental para la replicación del material genético bacteriano (63).

Se han descrito mecanismos de resistencia que están dados por sustituciones de aminoácidos en la región, donde se unen las fluoroquinolonas. Esta región se ha llamado Región Determinante de Resistencia a Quinolona (QRDR), la cual se ha identificado en diferentes estudios (64). En aislamientos resistentes se han observado mutaciones en *gyrA*, específicamente en la región conservada de Ala90 y Asp94, siendo estos los codones con mayor frecuencia de mutaciones, sin embargo se han descrito mutaciones en los codones Ala74, Gly88 y Ser91, los cuales también se han asociado con resistencia a fluoroquinolonas (65). Aunque recientemente se han reportado aislamientos con mutación en *gyrB* en la posición Asn533, resistentes a moxifloxacina y gatifloxacina pero susceptibles a ofloxacina (51).

3.9.4 Aminoglucósidos

La kanamicina y la amikacina son antibióticos aminoglucósidos, los cuales son usados como medicamentos de segunda línea, para el tratamiento de la tuberculosis MDR, muchos de estos antibióticos tiene su actividad a nivel de la traducción de proteínas. El mecanismo molecular de resistencia a estos medicamentos, son las mutaciones en el gen *rrs* (gen copia única) el cual codifica para la subunidad 16S de RNA ribosomal y ocurren con mayor frecuencia en aislamientos que presentan altos niveles de resistencia a kanamicina y amikacina, siendo la más común en el nucleótido A1401G, por lo tanto se ha reportado que pueden presentar resistencia cruzada entre ellos (66).

La capreomicina y la viomicina son antibióticos ciclo péptidos, también usados como medicamentos de segunda línea para el tratamiento de la tuberculosis-MDR, ambos inhiben la proliferación bacteriana bloqueando la peptidil transferasa. Se ha descrito resistencia cruzada entre kanamicina, capreomicina y viomicina (66). Mutaciones en el gen *tlyA*, que codifica para la RNA 2'-O-metiltransferasa y tiene como función metilar las subunidades 16S y 23S del RNA ribosomal causan ausencia de la actividad de metilación y por lo tanto resistencia a capreomicina y viomicina (67). Las mutaciones en A3Stop, A18Stop y G184Stop son las más comúnmente reportadas (10).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Detectar las mutaciones presentes en los aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* recolectados en los últimos 10 años, asociadas con resistencia a los medicamentos en TBMDR/ TBXDR.

4.2 Objetivos específicos:

- Identificar las mutaciones propias de los aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* asociadas con fenotipos MDR en los genes *rpoB*, *KatG*, *inhA* y *ahpC*.
- Identificar las mutaciones propias de los aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* asociadas con fenotipos XDR en los genes *gyrA*, *rrs* y *tlyA*.
- Identificar las mutaciones que puedan predecir la presencia de fenotipos MDR y XDR en los aislamientos colombianos.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Aislamientos Clínicos

Se incluyeron en el estudio 160 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de diferente origen geográfico del país, pertenecientes al biobanco del Grupo de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud, de los cuales 130 eran aislamientos fenotípicamente clasificados como multidrogosresistentes (MDR) y 30 aislamientos fenotípicamente susceptibles a los medicamentos de primera línea, recolectados entre 1999-2010. Que eran todos los aislamientos MDR de ese periodo, disponibles en el biobanco. Previamente se les determinó la sensibilidad a los medicamentos antituberculosos, por el método de las proporciones múltiples (68), siendo ésta la metodología de referencia para determinar la susceptibilidad a medicamentos antituberculosos de primera línea: estreptomina, isoniazida, rifampicina y etambutol (S, H, R, E). También previamente se les realizó genotipificación por la metodología *spoligotyping* (34). Además de los aislamientos colombianos, se utilizaron las cepas de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv, la ATCC 35822 resistente a rifampicina y la ATCC 35825 resistente a isoniazida como cepas control. ([Anexo A](#)).

5.2 Cultivo de los aislamientos clínicos

Todos los aislamientos del biobanco están resuspendidos en glicerol al 50% y criopreservados a -70°C, por lo cual los aislamientos seleccionados, fueron sometidos a un descongelamiento escalonado de -20°C por una hora y luego a 4°C por una hora. Posteriormente las bacterias en suspensión fueron cultivadas en medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC a 37°C, siendo este un medio enriquecido que permite una buena recuperación y crecimiento del bacilo en un tiempo corto, comparado con el medio sólido que puede tardar entre 15-20 días para obtener colonias visibles. El día 12 de crecimiento en medio líquido se eligió para realizar el repique a medio sólido LJ incubando durante 4 semanas a 37°C.

5.3 Extracción de ADN de los aislamientos clínicos

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Dick van Soolingen *et al*, (33) y se realizó de acuerdo al siguiente protocolo. A partir del crecimiento en medio LJ, se tomó una masa bacilar representativa de cada aislamiento, la cual se re suspendió en 400µl de buffer TE 1X (Tris 10 mM pH 8.0; EDTA 1mM) y se llevó a ebullición durante 30 minutos para inactivar los bacilos. Posteriormente se adiciono 50µl de lisozima [10mg/ml] y se incubo a 37°C durante toda la

noche. Después de 24 horas se adiciono 100µl de NaCl 5M, se mezcló vigorosamente e inmediatamente se le adiciono 5µl de proteinasa K [10mg/ml] y 70µl SDS 10% mezclando para llevar a baño de maría a 65°C durante 10 minutos, posteriormente se le adiciono 100µl CTAB/NaCl 5M previamente calentado. Se mezcló muy bien hasta obtener un color blanco de la suspensión y se llevó a centrifugar a 13.000 x g durante 10 minutos. Se tomó cuidadosamente la fase acuosa que se encuentra en la parte superior del tubo conteniendo los ácidos nucleicos y se colocó en un tubo eppendorf estéril, para adicionarle cloroformo alcohol isoamilico proporción 24:1, incubando a -20°C toda la noche. Posteriormente se lavó el ADN con 1000µl de etanol al 70% frío, grado biología molecular, para centrifugar a 13.000 x g durante 30 minutos, después de lo cual se descartó el sobrenadante y los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez los ADNs secos se resuspendieron en 50µl de buffer TE 0.1 X (Tris 10 mM pH 8.0; EDTA 1mM) y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

5.4 Cuantificación del ADN

Los ADNs se cuantificaron utilizando una metodología que permite evaluar la cantidad y calidad del ADN extraído. Se preparó un gel de agarosa al 0.8% P/V en buffer TBE 1X con bromuro de etidio 0.5 µg/ml. Se tomó 1 µl de ADN y se diluyó en 9 µl de buffer carga 1 X con RNAsa, posteriormente en el primer pozo se agregó un ADN con concentración conocida, el cual se usó para realizar el cálculo de las demás concentraciones de ADNs y se corrió una electroforesis a 100 voltios por 10 minutos, la cual se visualizó en el documentador de geles y usando el GenTools se calculó la concentración de los ADNs.

5.5 Diseño de los iniciadores

Para el diseño de los iniciadores se llevó a cabo una revisión bibliográfica teniendo en cuenta la información contenida en las bases de datos “*Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database*” (disponible en: <http://www.tbdreamdb.com>) (10) y en PubMed (disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) del NCBI. +Se tuvieron en cuenta publicaciones de los últimos 20 años, provenientes de diferentes áreas geográficas. Una vez elegidos los genes y las regiones de interés (las que incluyen las mutaciones reportadas y tienen mayor frecuencia) en cada uno de ellos, se diseñaron los iniciadores con ayuda del programa Primer3Plus (disponible en <http://www.bioinformatics.nl/primer3plus>), tomando como secuencias de referencia los genes de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, de tal forma que todos los iniciadores diseñados cumplieran las siguientes características ([Anexo B](#)):

- Tener una longitud no superior a 18-20 bases
- Tener un contenido de G+C alrededor del 50-60%
- Tener Tm entre 55-80 °C
- Evitar secuencias de tres o más C o G en el extremo terminal 3'
- Evitar la formación de secuencias auto-complementarias

Los iniciadores sintetizados se reconstituyeron de acuerdo a las concentraciones iniciales del fabricante, para llevar a una concentración inicial de 100 μM y posteriormente a partir de esta realizar una solución de trabajo a 25 μM para cada uno de los iniciadores.(Tabla 1).

Tabla 1. Iniciadores usados en el estudio con sus concentraciones iniciales y finales.

Iniciador	Concentración inicial (nmoles)	Agua (μl)	Concentración stock	Concentración de trabajo
Rif-sentido	199.8	1998 μl	100 μM	25 μM
Rif-antisentido	169.3	1693 μl		
KatG-sentido	191.0	1910 μl		
KatG-antisentido	155.2	1552 μl		
inhA-sentido	167.1	1671 μl		
inhA-antisentido	140.0	1400 μl		
ahpC-sentido	157.8	1578 μl		
ahpC-antisentido	150.1	1501 μl		
rrs-sentido	178.0	1780 μl		
rrs-antisentido	150.3	1503 μl		
tlyA-sentido	155.4	1554 μl		
tlyA-antisentido	161.0	1610 μl		
gyrA-sentido	165.4	1654 μl		
gyrA-antisentido	183.7	1837 μl		

5.6 Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para los blancos moleculares

Para la amplificación de cada blanco molecular, se evaluaron las concentraciones óptimas de todos y cada uno de los reactivos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa. El volumen final de cada reacción de PCR fue de 50 μl , siguiendo este orden para la estandarización:

1. Determinación de la concentración óptima de MgCl_2 (entre 0.5mM-3,5 mM)
2. Determinación de la concentración óptima de la mezcla de dNTP's (entre 0.1mM-1mM)
3. Determinación de la concentración óptima de cada Iniciadores (5pmol-35pmol)
4. Determinación de la temperatura óptima de anillamiento de cada par de iniciadores (entre 55°C-62°C)
5. Determinación del límite de detección de cada blanco molecular (entre 20ng-2fg de ADN)

En el [Anexo C](#) se encuentra el protocolo que se realizó para estandarizar las PCRs.

5.7 Amplificación y electroforesis para evidenciar los productos de PCR

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para cada una de los 7 blancos moleculares, se procedió a amplificar el fragmento de interés para cada uno de los 160 aislamientos. Las reacciones de amplificación se realizaron de acuerdo a cada temperatura de anillamiento estandarizada para cada gen y se verificó la presencia de los productos amplificados.

Con el fin de confirmar la amplificación de los productos para cada uno de los siete blancos moleculares, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % P/V, tomando 10 μ l de cada uno de los productos de PCR y adicionando 3 μ l de buffer de carga 6X.

Teniendo como referencia el primer pozo de cada gel se depositaron 10 μ l de marcador de peso molecular de 100 pb (invitrogen), para tener un patrón de comparación del tamaño de cada amplificado. Este gel se corrió a 100 voltios durante 2 horas, posteriormente el gel se llevó al foto documentador de geles para tomar la fotografía y verificar la amplificación y el tamaño de los amplificados. ([Anexo D](#))

En los casos en los cuales no se obtuvo amplificación, se realizó repetición de la PCR hasta obtener un producto amplificado verificable, para lo cual se realizó una nueva extracción de ADN del aislamiento correspondiente.

5.8 Purificación de los amplificados de cada gen

Dado que los fragmentos amplificados se someterán a secuenciación es necesario realizar la purificación de los productos de PCR, con el fin de eliminar todos los posibles contaminantes. Para tal efecto se utilizó el Kit de Quiagen (QIAquick), el cual permite purificar productos de PCR de tamaños del amplificado entre 100 pb y 10 kb y volúmenes entre 30 μ l y 50 μ l de producto de PCR, realizando el siguiente procedimiento.

Preparación de los reactivos:

- Reconstituir el buffer PE de lavado adicionándole 220ml de etanol (96-100%)
- Reconstituir el buffer PB de unión adicionándole indicador en proporción 1:250, para observar un color amarillo que indica que el pH se encuentre ≤ 7.5 .

Procedimiento

1. Adicionar 5 volúmenes de buffer PB por 1 volumen de producto de PCR, mezclar muy bien, si el color de la mezcla es naranja o violeta, adicionar 10 μ l de acetato de sodio al 3M a pH 5.0 y mezclar nuevamente, el color de la mezcla debe cambiar a amarillo lo que indica el pH correcto.
2. Colocar una columna QIAquick en el tubo colector y adicionar la mezcla de producto de PCR con buffer PB a cada columna, la cual permite un volumen hasta de 2 ml.
3. Centrifugar 30-60 segundos a 17900 x g para pasar toda la muestra a través de la columna al tubo colector y descartar este filtrado.
4. Una vez unido el DNA a la membrana de silica contenida dentro de la columna, se realizan lavados por centrifugación con el fin de eliminar cualquier residuo contaminante.

5. Se le adiciona 750 μ l de buffer de lavado PE a la columna de QIAquick, y se centrifuga a 17900 \times g por 30-60 segundos para lavar el DNA unido a membrana y descartar el filtrado, para realizar un segundo lavado.
6. Se centrifuga una vez más la columna 1 minuto con el objetivo de descartar completamente el buffer de lavado que se no se había eliminado en las primeras centrifugaciones.
7. Colocar la columna en un nuevo tubo limpio estéril para eluir el ADN, añadiendo 50 μ l de buffer EB de elución (Tris Cl 10 mM a pH 8,5) o agua con (pH 7,0-8.5) en el centro de la membrana y centrifugar la columna a 17900 \times g por 1 min. [\(Anexo E\)](#)

5.9 Cuantificación de la concentración de los productos de amplificación

Teniendo en cuenta que es necesario conocer exactamente la concentración de los productos a secuenciar, se procedió a cuantificarlos por medio de espectrofotometría a 260nm, utilizando el equipo Nanodrop 1000, el cual no solo nos permitió observar la concentración de los productos sino además ver la calidad del ADN, puesto que el ADN se puede contaminar con ARN, proteínas o algún residuo que se allá generado en el proceso de extracción, afectando negativamente los resultados de la secuenciación, por lo tanto se midió la absorbancia de la muestra a 280 y 230 nm y comprobar la relación A260/A280 y A260/A230, lo esperado es que el DNA molde tenga una relación A260/A280 núm. entre 1.8-2.0.

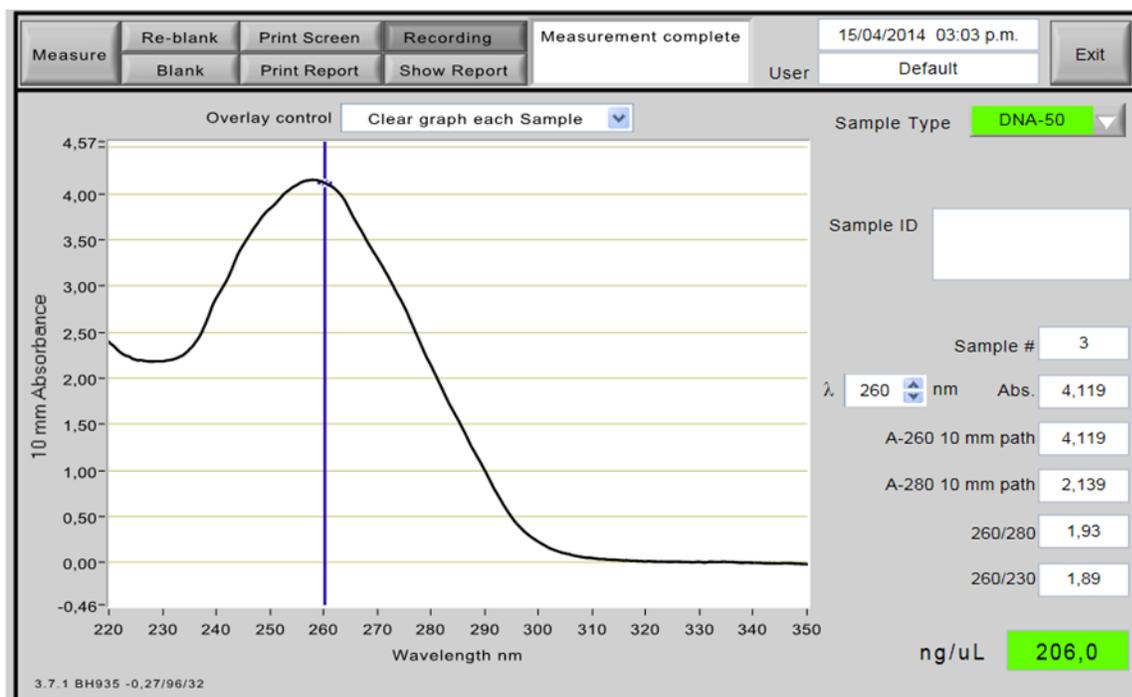


Figura 1. Cuantificación del ADN de uno de los aislamientos, por espectrofotometría.

5.10 Secuenciación

Se secuenciaron los productos amplificados y purificados de los genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *tlyA*, *rrs* y *gyrA*. Para la secuenciación de los productos amplificados de los blancos moleculares, se utilizaron los mismos iniciadores usados en la amplificación de los fragmentos, tanto el sentido como antisentido. Se realizó secuenciación automática del DNA mediante electroforesis capilar en el Analizador genético ABI PRISMA® 3100 (Applied Biosystems), usando la química *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems).

Procedimiento

1. Saber claramente el tamaño del gen en pb que se va a secuenciar, dependiendo de esto se sabe que concentración de ADN será necesaria, según la siguiente Tabla.

DNA molde	Cantidad
Productos de PCR: 100-200pb 200-500pb 500-1000pb 1000-2000pb >2000pb	1-3ng 3-10 ng 5-20ng 10-40ng 40-100ng
DNA monocatenario	50-100ng
DNA doble hebra	200-500ng
Cosmidos , BAC	0.5-1.0 µg
DNA genómico bacterial	2-3 µg

2. Se resuspendieron los iniciadores a una concentración de 3.2 pMol, utilizando los mismos con los que se amplificó el fragmento.
3. Organizar en la tabla de trabajo que consiste en una placa de 96 pozos, el orden en que se va a secuenciar cada uno de los amplificados según su concentración, los cuales se organizan de mayor a menor concentración.
4. Realizar la mezcla para secuenciar, con el Kit de Applied Biosystems que se utiliza para secuenciar a unas concentraciones ya establecidas.
5. Adicionar en la placa de 96 pozos la cantidad de mezcla que se necesita para cada uno de los amplificados, de acuerdo a su concentración y el orden de la tabla previamente organizada. Para un volumen final de cada pozo de 10 µl.
6. Precipitar los productos para llevar a la plataforma de secuenciación. En este sistema todas las muestras son purificadas mediante precipitación con el fin de eliminar el ruido de fondo y los terminadores sobrantes colaborando en la obtención de unos resultados satisfactorios.

7. Llevar a termociclar en el Analizador genético ABI PRISMA® 3100 (Applied Biosystems).

Las mezclas de PCR con un volumen final de 10µL para la secuenciación estaban compuestas de: 1,5 µM de MgCl₂, 5 µl de 10X PCR buffer, 1U de AmpliTaq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems, UK) y 200 µM de cada dNTP (Applied Biosystems, UK). A cada reacción se agregaron 10ng de ADN molde y se siguió un programa de amplificación a 95°C por 10 minutos, 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto.

(Anexo G)

5.10.1 Análisis de las secuencias

Usando como software de análisis el que recomiendo para este equipo de secuenciación, se usó el programa *SeqScope* versión 3.0, se creó una carpeta para cada uno de los genes, con las especificaciones para cada gen la cual contiene todas las secuencias de los 160 aislamientos sentido y antisentido y su secuencia de referencia respectiva para cada gen para realizar un buen análisis de cada secuencia.

Una vez creadas las carpetas y verificando los parámetros con los cuales se debía analizar estas, se logró observar los cromatogramas de cada una de las secuencias y poder identificar cualquier alteración de la secuencia, verificando la altura y posición de cada pico que se encuentra representado por una base nucleotídica específica.

El análisis se realiza con el objetivo de identificar cualquier cambio que se pueda observar en la secuencia de nucleótidos, ya sea polimorfismos de nucleótido simple (SNP), mutaciones, deleciones o inserciones, en las regiones secuenciadas y comparar estas con las secuencias de referencia del *M. tuberculosis H37Rv* para cada gen. Esta secuencia se usa como referencia puesto que no presenta alteraciones en su secuencia y es nuestra cepa control, además, para poder comparar los resultados obtenidos con los publicados en otros estudios realizados.

6 RESULTADOS

6.1 Distribución geográfica de los aislamientos incluidos en el estudio

En la Tabla 2 se muestra el origen geográfico de los aislamientos clínicos estudiados, distribuidos según departamento, número de aislamientos y número de identificación en el estudio.

En la Figura 2 se observa el departamento de procedencia de los aislamientos estudiados, distribuidos según fenotipo de susceptibilidad a los medicamentos. Es de resaltar que los departamentos de Magdalena, Guaviare, San Andrés, Vichada, Vaupés y Guainía no se encuentran representados en la población de estudio y que un alto porcentaje (27.5%) de los aislamientos provenían del Valle del Cauca.

Tabla 2. Origen geográfico de los aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* incluidos en el estudio.

Departamento	Aislamientos		Total	Número de identificación en el estudio
	Susceptibles	MDR		
Amazonas	1	0	1	59
Antioquia	3	9	12	6,24,42,58,62,70,97,98,100,150,151,154
Arauca	0	1	1	52
Atlántico	0	12	12	18,19,20,38,45,51,55,56,60,64,106,113
Bogotá D.C	2	2	4	54,75,147,160
Bolívar	1	5	6	11,81,85,102,114,145
Boyacá	1	1	2	34,158
Caldas	3	0	3	131,148,157
Caquetá	1	3	4	26,33,37,153
Casanare	2	1	3	4,133,143
Cauca	2	4	6	27,41,46,50,144,156
Cesar	1	3	4	12,16,101,135
Choco	0	6	6	9,65,72,78,84,110
Córdoba	1	2	3	76,107,134
Cundinamarca	0	1	1	3
Huila	2	3	5	28,93,111,137,149
Guajira	0	5	5	13,32,79,82,108
Meta	1	2	3	5,88,138
Nariño	3	3	6	22,61,104,136,152,155
Norte de Santander	1	9	10	10,17,36,39,57,80,94,103,112,139
Putumayo	0	3	3	1,68,109
Quindío	1	0	1	140
Risaralda	1	1	2	21,132
Santander	3	1	4	44,141,142,146
Sucre	0	1	1	23
Tolima	0	8	8	2,7,8,66,87,90,96,99
Valle	0	44	44	14,15,25,29,30,31,35,40,43,47,48,49,53,63,67,69,71,73,74,77,83,86,89,91,92,95,105,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,
Total	30	130	160	

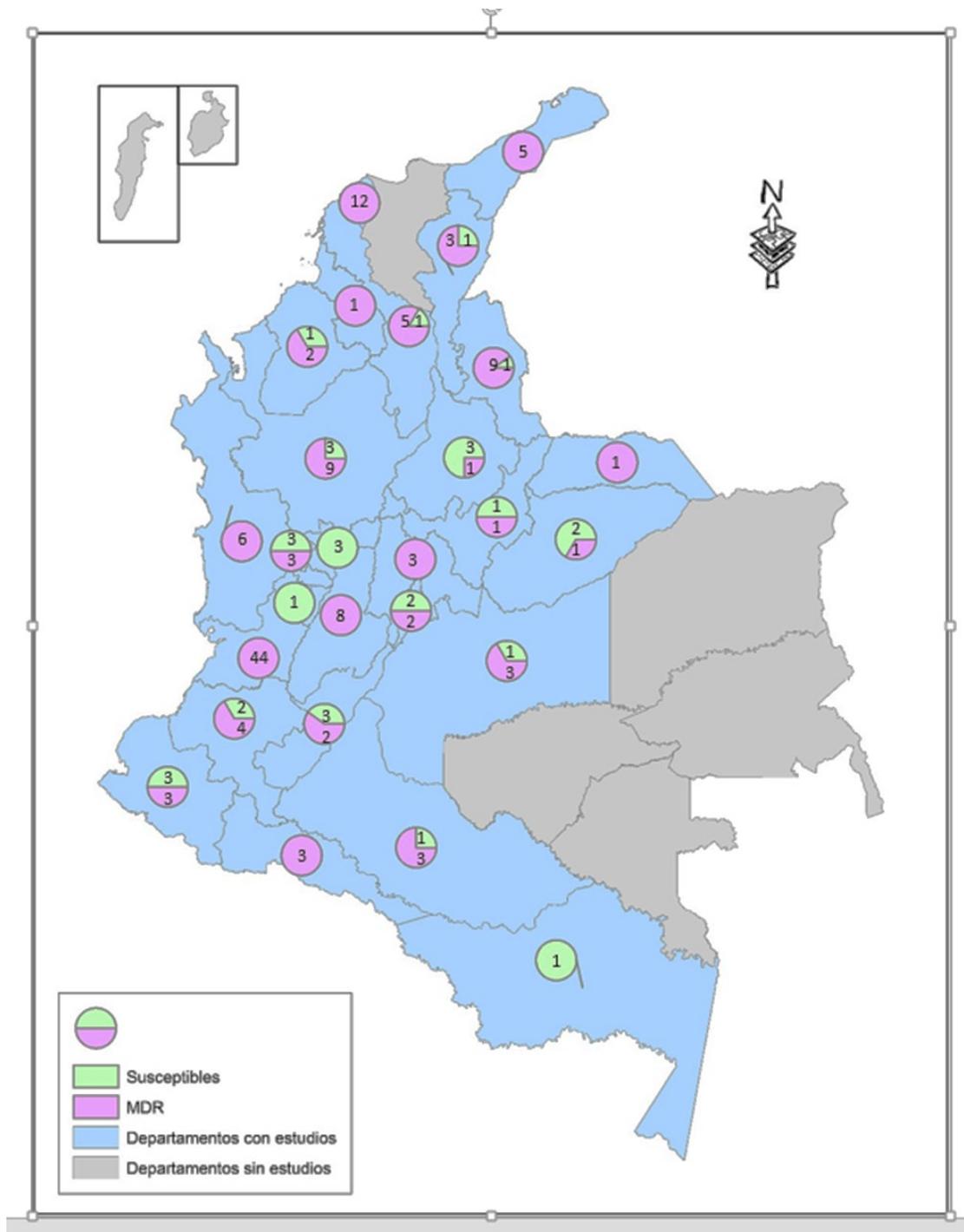


Figura 2. Distribución de la procedencia de los aislamientos estudiados según su fenotipo de susceptibilidad a los medicamentos.

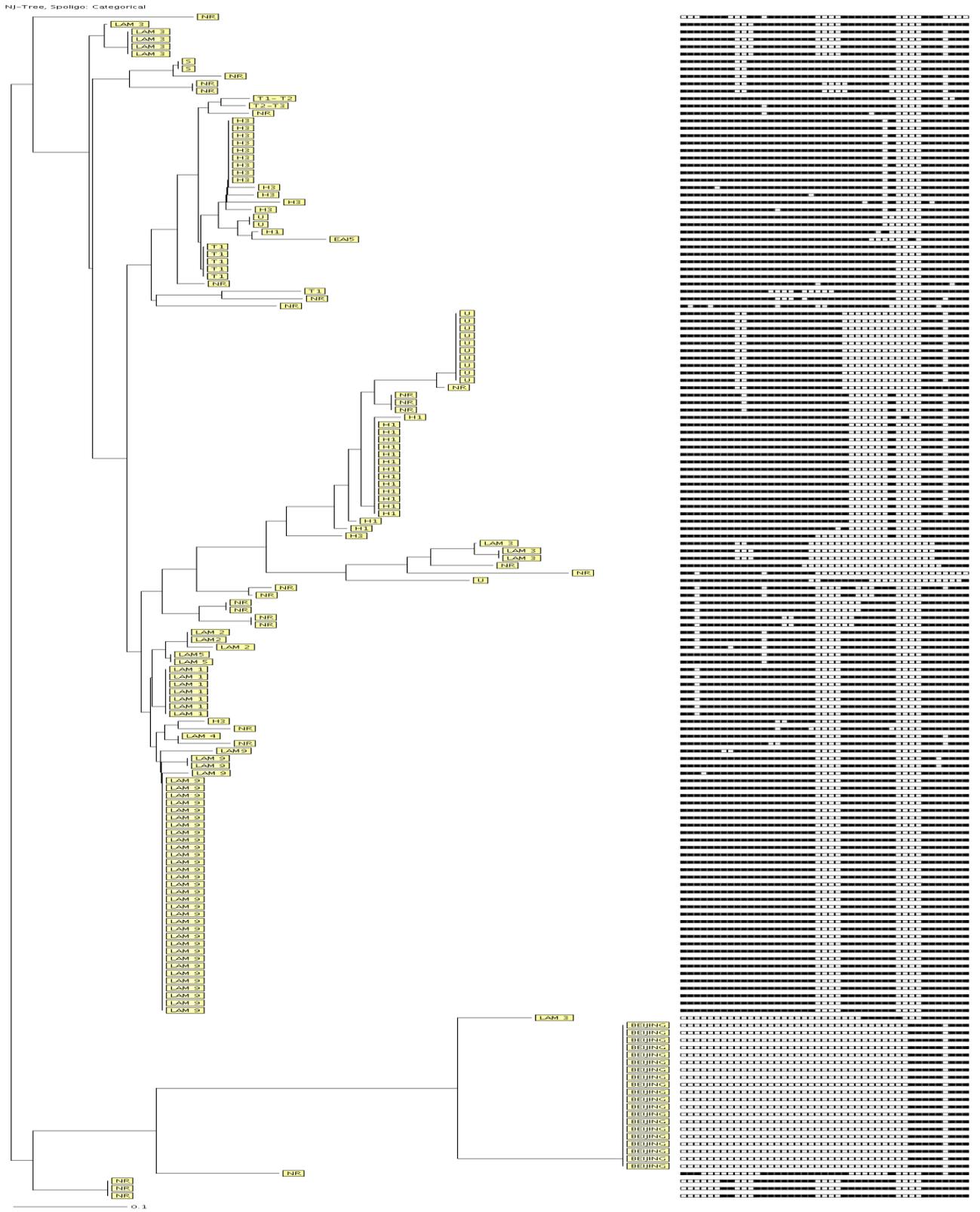


Figura 3. Análisis filogenético de los aislamientos incluidos en el estudio según su espoligotipo.

6.3 Resultados de la cuantificación del ADN

En la Figura 4, se pueden observar los ADNs usados como referencia; en las figuras 4A y 4B se observa la calidad y cantidad de los ADN extraídos a partir de los aislamientos clínicos incluido en el estudio. Vale la pena resaltar que la calidad y cantidad de los ADNs extraídos fue muy buena debido a que el protocolo usado es un método específicamente diseñado y estandarizado para micobacterias a nivel mundial.



Figura 4. ADNs de referencia de *M. tuberculosis H37Rv*. 1=1 μ g; 2=0,4 μ g; 3=0,25 μ g; 4=0,25 μ g; 5=0,20 μ g; 6=0,17 μ g; 7=0,13 μ g; 8=0,11 μ g

1 2 3 4 5 6 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 24 25 26 27



Figura 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 .-27.

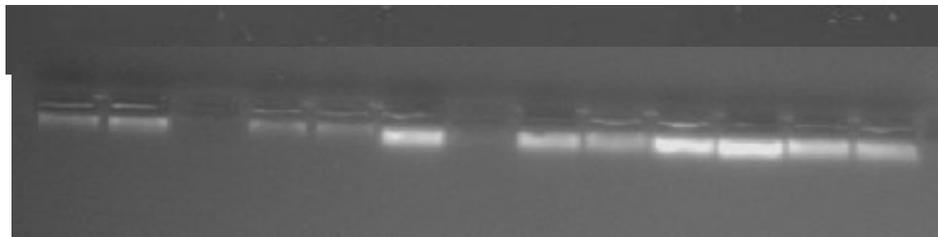


Figura 4B. Calidad y cantidad del ADN extraídos a partir de los aislamientos clínicos estudiados del 28-53.

6.4 Diseño de iniciadores y sondas

El diseño de los siete pares de iniciadores se encuentra en el [Anexo B](#) y en la tabla 4 se observan las características de los iniciadores.

Tabla 4. Características de los iniciadores diseñados para el estudio.

Gen	Iniciadores	Secuencia (5' → 3')	T _m (°C) ¹	%GC ²	Producto PCR Tamaño (pb)	Posición de amplificación (nt)
<i>rpoB</i>	Sentido	GACGACCATCGACCACTTC	54,6	55,5	616	1084-1699
	Antisentido	AGGGCACGTACTCCACCTC	60,1	63,1		
<i>KatG</i>	Sentido	GGGACATCGAGGAAGTGATG	60,4	55,0	1516	233-1748
	Antisentido	GATTCCACGTCGGTTTGTTTC	60,3	50,0		
<i>inhA</i>	Sentido	GGCAAACGGATTCTGGTTAG	59,5	50,0	765	19-783
	Antisentido	GTCGGCGTAGATGATGTCAC	59,1	55,0		
<i>ahpC</i>	Sentido	GCTAACCATTGGCGATCAA	59,6	47,3	490	9-498
	Antisentido	GTCGAGCACTCGCAGTACCT	60,0	60,0		
<i>gyrA</i>	Sentido	CGCAGCTACATCGACTATGC	59,6	55,0	322	76-397
	Antisentido	GGGCTTCGGTGTACCTCAT	59,9	57,8		
<i>rrs</i>	Sentido	GGTGAGTAACACGTGGGTGA	59,4	55,0	1404	107-1510
	Antisentido	CCGGTACGGCTACCTTGTT	60,0	57,8		
<i>tlyA</i>	Sentido	GTTGACCCGAGCTAGTCC	60,9	63,1	789	19-807
	Antisentido	CTACGGGCCCTCGCTAAT	60,1	61,1		

¹ T_m: Temperatura de anillaje

² %GC: Porcentaje Guanina /Citosina

6.6 Resultados de la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para los blancos moleculares

Tabla 5. Concentraciones y volúmenes finales estandarizados para los siete blancos moleculares.

A (<i>rpoB</i>)			B (<i>katG</i>)		
	[] original	1 X		[] original	1 X
dNTPs	2,5 mM c/u	0,50	dNTPs	2,5 mM c/u	6,00
Primer 1	25 µMolar	0,30	Primer 1	25 µMolar	0,50
Primer 2	25 µMolar	0,30	Primer 2	25 µMolar	0,50
MgCl ₂	50mM []	1,50	MgCl ₂	50mM []	1,50
Buffer	10X	5,00	Buffer	10X	5,00
Taq pol	5 U/µL	0,25	Taq pol	5 U/µL	0,25
DNA		1,00	DNA		1,00
Agua MQ		41,15	Agua MQ		35,25
V FINAL	50µL	50,00	V FINAL	50µL	50,00

C (<i>inhA</i>)			D (<i>ahpC</i>)		
	[] original	1 X		[] original	1 X
dNTPs	2,5 mM c/u	0,50	dNTPs	2,5 mM c/u	0,50
Primer 1	25 µMolar	0,10	Primer 1	25 µMolar	0,10
Primer 2	25 µMolar	0,10	Primer 2	25 µMolar	0,10
MgCl ₂	50mM []	1,50	MgCl ₂	50mM []	1,50
Buffer	10X	5,00	Buffer	10X	5,00
Taq pol	5 U/µL	0,25	Taq pol	5 U/µL	0,25
DNA		1,00	DNA		1,00
Agua MQ		41,55	Agua MQ		41,55
V FINAL	50µL	50,00	V FINAL	50µL	50,00

E (<i>gyrA</i>)			F (<i>rrs</i>)		
	[] original	1 X		[] original	1 X
dNTPs	2,5 mM c/u	0,50	dNTPs	2,5 mM c/u	0,50
Primer 1	25 µMolar	0,20	Primer 1	25 µMolar	0,40
Primer 2	25 µMolar	0,20	Primer 2	25 µMolar	0,40
MgCl ₂	50mM []	1,50	MgCl ₂	50mM []	2,00
Buffer	10X	5,00	Buffer	10X	5,00
Taq pol	5 U/µL	0,25	Taq pol	5 U/µL	0,25
DNA		1,00	DNA		1,00
Agua MQ		40,85	Agua MQ		40,45
V FINAL	50µL	50,00	V FINAL	50µL	50,00

G (<i>tlyA</i>)		
	[] original	1 X
dNTPs	2,5 mM c/u	0,50
Primer 1	25 µMolar	1,00
Primer 2	25 µMolar	1,00
MgCl ₂	50mM []	1,50
Buffer	10X	5,00
Taq pol	5 U/µL	0,25
DNA		1,00
DMSO		1,00
Agua MQ		38,75
V FINAL	50µL	50,00

6.7 Resultados de la amplificación y electroforesis de los productos de PCR

En el [Anexo D](#) se observan los productos de amplificación para cada uno de los blancos moleculares, con sus respectivos tamaños de producto, donde podemos evidenciar que la amplificación fue exitosa para el 100% de los aislamientos, con cada uno de los blancos moleculares estudiados, para un total de 1120 productos de amplificación de todos los genes.

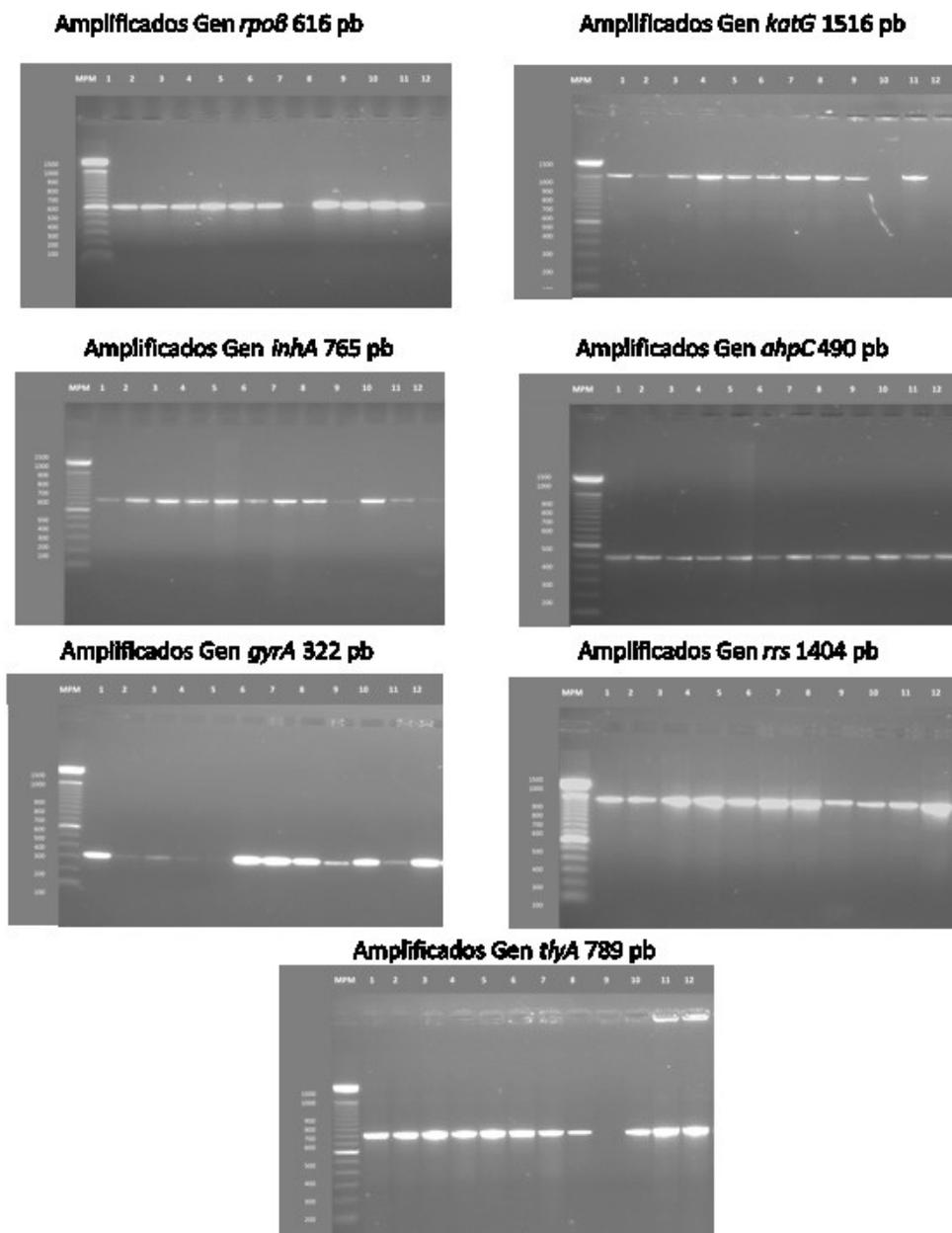


Figura 5. Productos de amplificación de los 7 blancos moleculares estudiados.

6.8 Cuantificación de los productos purificados

En el [ANEXO H](#) se puede observar cual fue la concentración de los productos amplificados que fueron purificados de cada uno de los blancos moleculares, que quedaron listos para la secuenciación.

El rango de concentración de los amplificados purificados de *rpoB* fue de 7.1ng/μl a 30.9ng/μl; para *KatG* fue de 7.5ng/μl a 29.8ng/μl; para *inhA* fue de 5.0ng/μl a 60.5ng/μl; para *ahpC* fue de 5.0ng/μl a 39.5ng/μl; para *gyrA* el rango fue de 5.4ng/μl a 46.5ng/μl; para *rrs* el rango fue de 4.9ng/μl a 39.8ng/μl y para *tlyA* el rango fue de 3.7ng/μl a 64.8ng/μl.

6.9 Resultados de secuenciación

Los productos secuenciados presentaron en su gran mayoría resultados analizables para los siete genes estudiados, por lo tanto en la Tabla 6 se muestra el comportamiento de los diversos blancos estudiados en términos de eficiencia de la metodología la cual se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\% \text{ resultados analizables de secuencias}}{\text{N}^\circ \text{ de aislamientos analizados}}$$

Tabla 6. Eficiencia obtenida en la secuenciación de los siete blancos moleculares estudiados.

Gen	Secuenciación sentido		Secuenciación antisentido	
	n	eficiencia	n	eficiencia
<i>rpoB</i>	160	100%	160	100%
<i>katG</i>	160	88.8%	160	91.3%
<i>inhA</i>	160	98.2%	160	98.2%
<i>ahpC</i>	160	100%	160	100%
<i>gyrA</i>	160	97.5%	160	97.5%
<i>rrs</i>	160	94.4%	160	93.1%
<i>tlyA</i>	160	87.5%	160	87.5%

Se observó la mayor eficiencia de secuenciación o secuenciación exitosa, en los genes *rpoβ* y *ahpC*, tanto para la secuenciación sentido como la antisentido.

6.9.1 Secuenciación del fragmento de 616 pb del gen *rpoβ*.

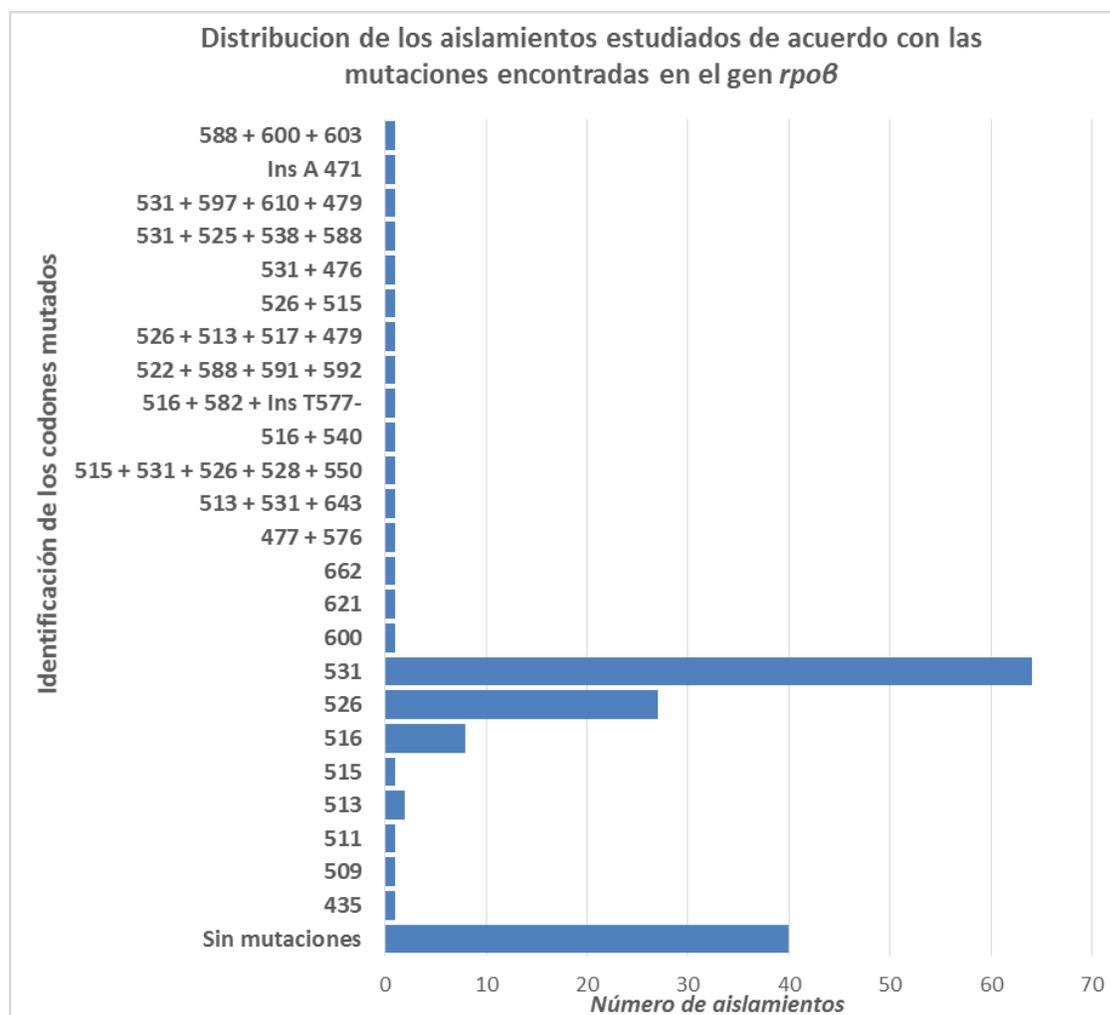


Figura 6. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *rpoβ*.

Entre los 160 aislamientos estudiados, todos los pansusceptibles (30) y 10 de los MDR, no presentaron mutaciones en la región estudiada.

Como se muestra en la Figura 6, los aislamientos colombianos presentaron dos, tres, cuatro y hasta cinco mutaciones simultaneas en el fragmento de 616 pb del gen *rpoβ* amplificado y secuenciado. A su vez, es importante resaltar que el 11% de los aislamientos MDR estudiados portan mutaciones MDR en la región corriente abajo de la zona considerada RRDR (codón 505 al codón 533) (Figura 6) que es la evaluada en la gran mayoría de publicaciones a nivel mundial. Igualmente, el 15% de los

aislamientos MDR colombianos contienen mutaciones en la región corriente arriba de la zona caliente RRDR (Figura 6). Por lo tanto, tan solo el 87% de los aislamientos MDR tenían mutaciones en esta región y el 6% exclusivamente fuera de esta.

Tabla 7. Distribución de las mutaciones en el gen *rpoB* de los 160 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* estudiados (130 con fenotipo MDR y 30 con fenotipo susceptible).

Codón	Cambio nucleótido	Cambio en aminoácido	N° aislamientos
435	GAC/GTC	Asp-Val	1
471	Ins A	Ins A	1
476	CGG/AGG	Arg-Arg	1
477	GTG/ATG	Val-Met	1
479	ATG/ATA	Met-Ile	1
	ATG/AAG	Met-Lys	1
509	AGC/AGA	Ser-Arg	1
511	CTG/CCG	Leu-Pro	1
513	CAA/GAA	Gln-Glu	2
	CAA/CCA	Gln-Pro	2
515	ATG/GTG	Met-Val	2
	ATG/ATT	Met-Ile	1
516	GAC/GTC	Asp-Val	9
517	CAG/CAA	Gln-Gln	1
522	TCG/TTG	Ser-Leu	1
525	ACC/CAC	Thr-His	1
526	CAC/CAA	His-Gln	1
	CAC/GAC	His-Asp	7
	CAC/TGC	His-Cys	1
	CAC/AAC	His-Asn	4
	CAC/GGC	His-Gly	1
	CAC/CTC	His-Leu	2
528	CAC/TAC	His-Tyr	13
	CGC/CCC	Arg-Pro	1
531	TCG/TTT	Ser-Phe	1
	TCG/TTG	Ser-Leu	65
	TCG/TGG	Ser-Trp	3
538	CTG/CCG	Leu-Pro	1
540	CGT/CGA	Arg-Arg	1
550	GTG/GCG	Val-Ala	1
576	TCG/TAG	Cys-TAG	1
577	GTG/ΔG	Val-ΔG	1
582	AAC/TAC	Asn-Tyr	1
588	GAA/TAA	Glu-Stop	1
	GAA/AAA	Glu-Lys	2
591	TAC/TAT	Tyr-Tyr	1
592	CGC/GGC	Arg-Gly	1
597	GGC/GGT	Gly-Gly	1
600	AGC/ACC	Ser-Thr	1
	AGC/AGT	Ser-Ser	1
603	ATC/AGC	Ile-Ser	1
610	GAG/AAG	Glu-Lys	1
621	TCG/TCT	Ser-Ser	1
643	GTG/GAG	Val-Glu	1
662	GTC/ITC	Val-Phe	1
Sin mutación			42

Sin Dato	0
Total	160

En las secuencias obtenidas del fragmento de 616 pb del gen *rpoB*, se encontraron 45 diferentes genotipos de mutación en 32 codones, de los cuales 7 corresponden a mutaciones sinónimas. (Tabla 7).

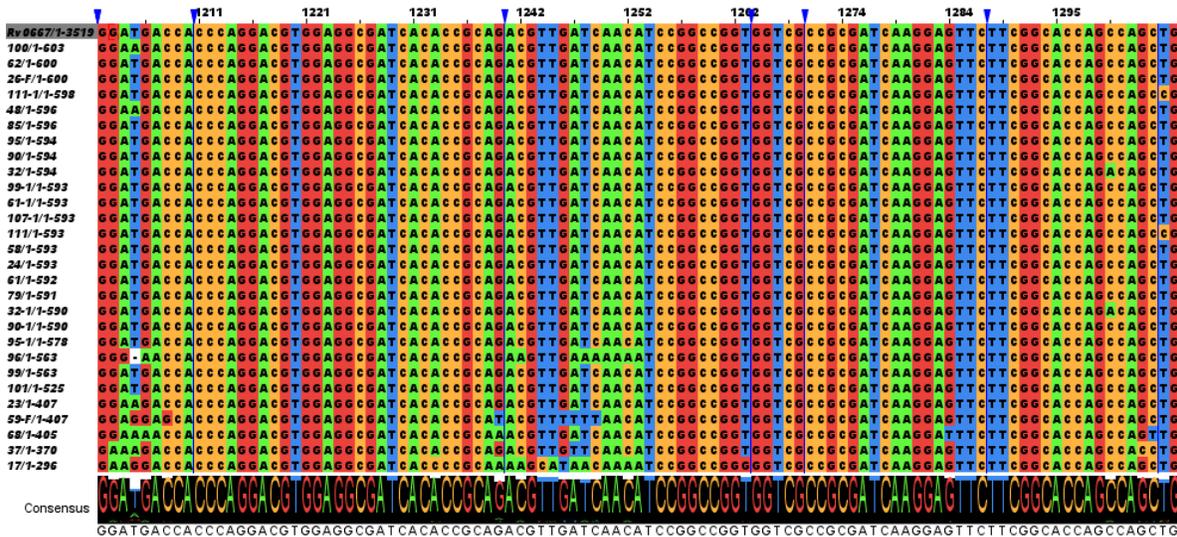


Figura 7. Alineamiento de algunos aislamientos colombianos con genotipo resistente a rifampicina, mostrando las mutaciones del gen *rpoB*, en codones, corriente abajo del RRDR, diferentes a los reportados previamente.

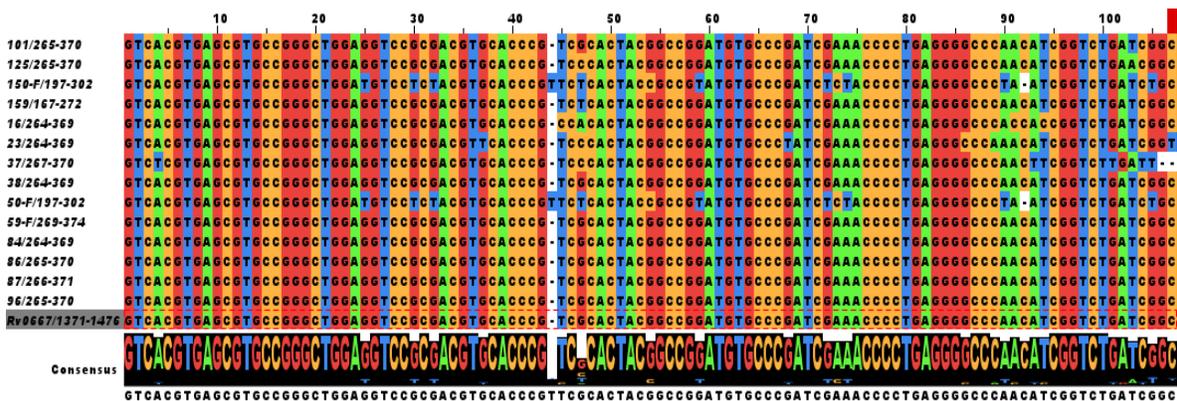


Figura 8. Alineamiento de algunos aislamientos colombianos con genotipo resistente a rifampicina, mostrando las mutaciones del gen *rpoB*, en codones, corriente arriba del RRDR, diferentes a los reportados previamente.

6.9.2 Secuenciación del fragmento de 1516 pb del gen *katG*.

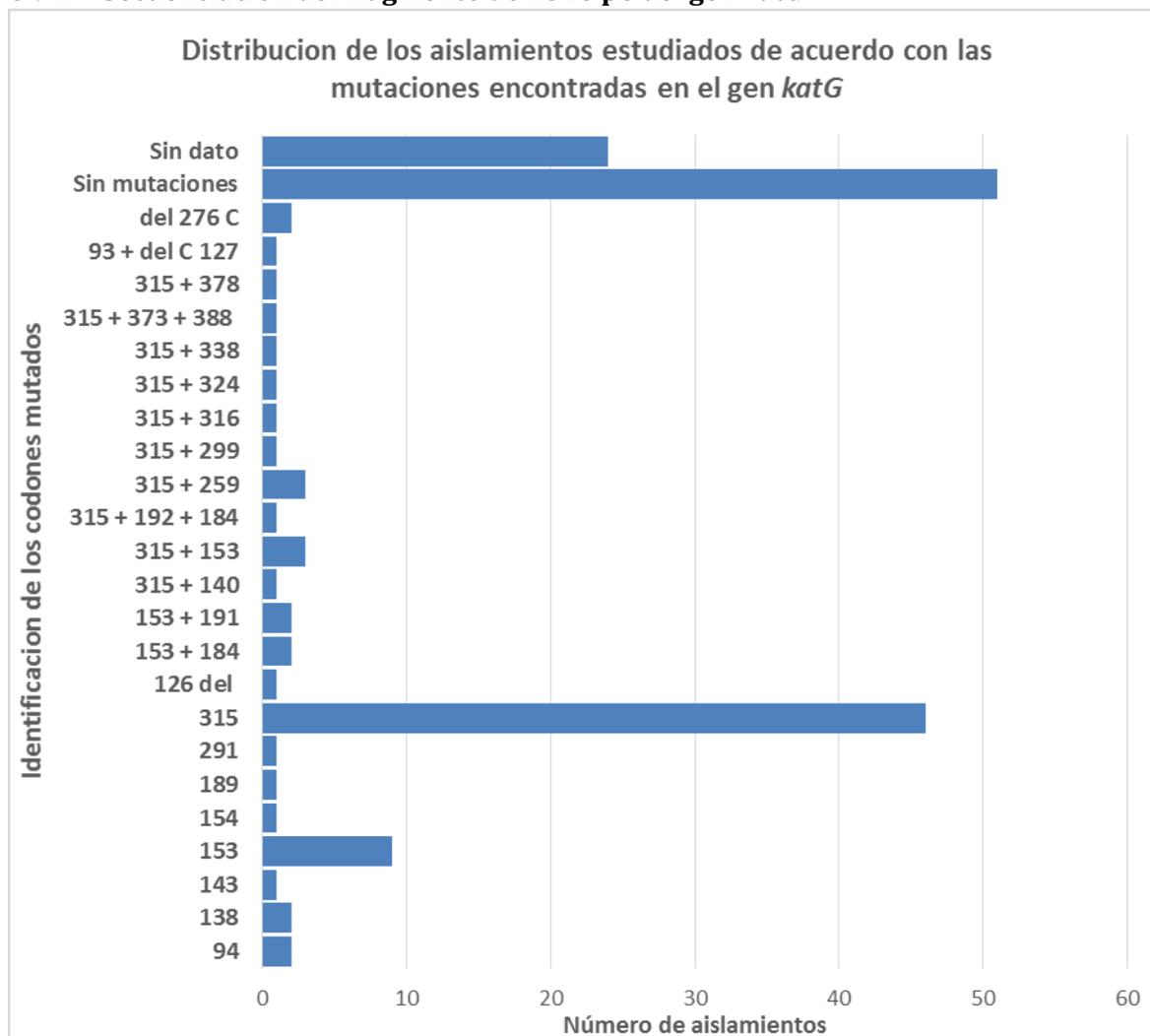


Figura 9. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *katG*

Como se muestra en la Figura 9, entre los 160 aislamientos estudiados, todos los pansusceptibles (30) y 21 de los MDR, no presentaron mutaciones en el fragmento de 1516 pb del gen *katG* amplificado y secuenciado; además, los aislamientos colombianos mostraron dos y tres mutaciones simultáneas.

El 46,9% de los aislamientos MDR estudiados presentaron mutaciones en el codón 315, sin embargo es importante resaltar que 28% de los aislamientos MDR portan mutaciones en codones diferentes al 315 que es el que en la mayoría de las publicaciones a nivel mundial han reportado alta asociación con resistencia a isoniazida. En las secuencias obtenidas se encontraron 25 codones con mutaciones que representan 37 diferentes genotipos, encontrando 5 mutaciones sinónimas, los cuales se describen en la (Tabla 8). En el presente estudio se encontró alta proporción de aislamientos con mutación en el codón 153, que podría ser un marcador importante de resistencia a isoniazida.

Tabla 8. Distribución de las mutaciones en el gen *katG* de los 160 aislamientos clínicos de *M tuberculosis* estudiados (130 con fenotipo MDR y 30 con fenotipo susceptible).

Codón	Cambio nucleótido	Cambio en aminoácido	N° aislamientos
93	GCC/CGC	Ala-Ala	1
94	GAC/GCC	Asp-Ala	1
	GAC/GTC	Asp-Val	1
Del 126 C	CAG/ΔGA	Gln-ΔGA	1
Del 127 C	CGG/ΔGG	Arg-ΔGG	1
138	AAC/CAC	Asn-His	2
140	AGC/AAC	Ser-Asn	1
143	AAG/GAG	Lys-Glu	1
	AAG/CTC	Lys-Leu	2
153	AAG/AAA	Lys-Lys	1
	AAG/AAT	Lys-Asn	11
	AAG/CAC	Lys-His	1
	AAG/CCT	Lys-Pro	2
	AGG/ACT	Lys-Thr	1
	AAG/TTC	Lys-Phe	1
154	AAG/CCT	Lys-Pro	1
184	GGC/GGT	Gly-Gly	1
	GGC/GTC	Gly-Val	1
189	GAC/AAC	Asp-Asn	1
191	TGG/TTT	Trp-Phe	1
	TGG/TGT	Trp-Cys	1
192	GAG/TAG	Glu-Tyr	1
259	GTC/CTC	Val-Leu	2
260	GTC/CTC	Val-Leu	1
Del 276 C			2
291	GCT/GAT	Ala-Asp	1
299	GGC/GGG	Gly-Gly	1
	AGC/AAC	Ser-Asn	2
315	AGC/ACC	Ser-Thr	57
	AGC/ACA	Ser-Thr	1
	AGC/ATC	Ser-Ile	1
316	GGC/AGC	Gly-Ser	1
324	ACC/TCC	Thr-Ser	1
338	GGC/GGT	Gly-Gly	1
373	CGC/TGC	Arg-Cys	1
378	GAG/AAG	Glu-Lys	1
388	CCG/TCG	Pro-Ser	1
Sin mutación			50
Sin Dato			24
Total			160



Figura 10. Alineamiento de algunos aislamientos colombianos con genotipo resistente a isoniazida, mostrando las mutaciones en el codón 315 del gen *katG*.

6.9.3 Secuenciación del fragmento de 765 pb del gen *inhA*.

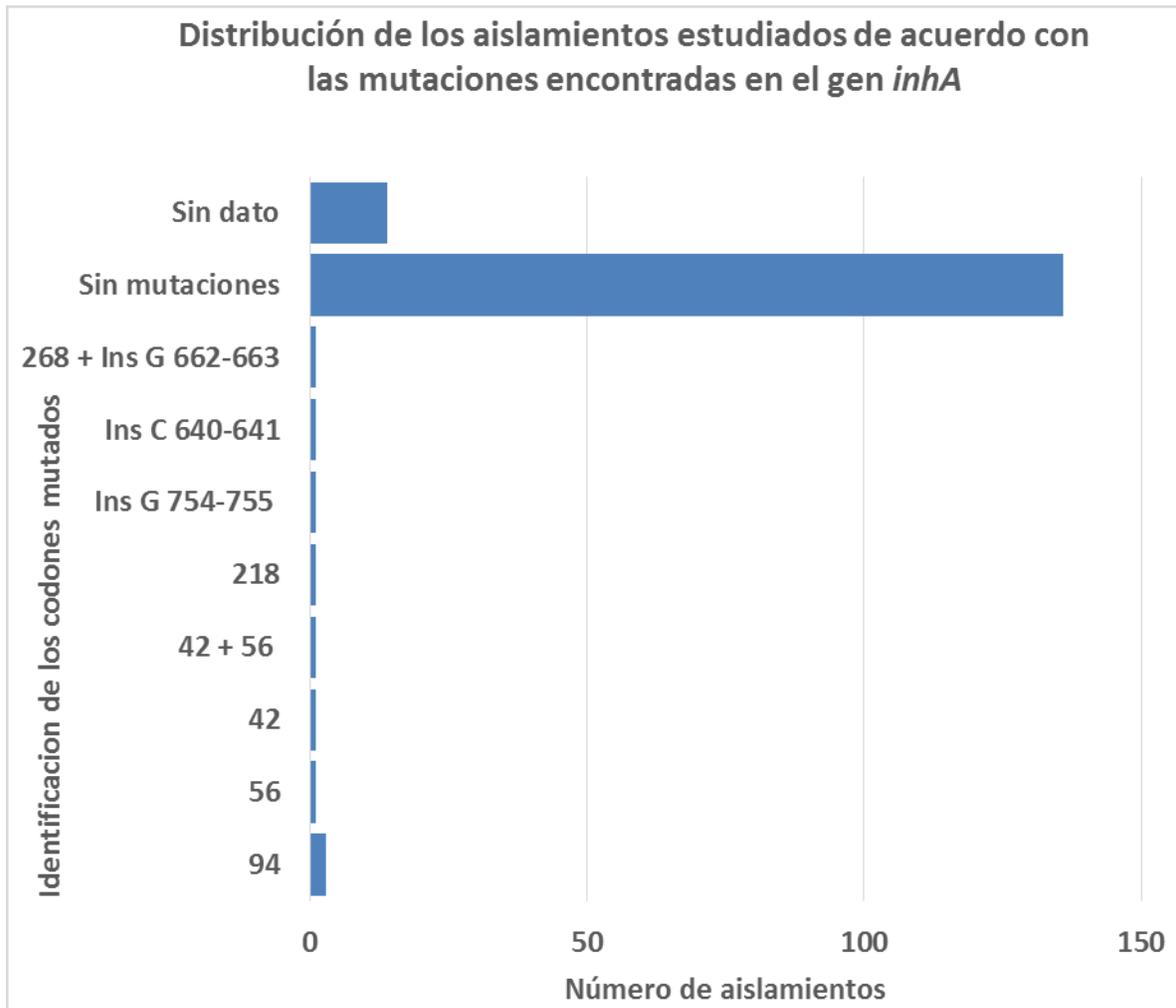


Figura 11. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *inhA*.

Entre los 160 aislamientos estudiados, 136 de ellos no presentaron mutaciones en la región estudiada. Entre los restantes, 10 presentaron mutaciones y todos correspondían a aislamientos MDR.

La mutación más frecuente entre las pocas encontradas fue en el codón 94, previamente reportada (55).

En los aislamientos secuenciados, el gen *inhA*, fueron encontrados 10 genotipos mutantes en 9 codones, de los cuales uno es una mutación sinónima y uno produce codón de parada.

Tan solo uno de los aislamientos resistentes a isoniazida, que presentaron mutación en el gen *inhA*, no tenía mutación en *katG* y por lo tanto serviría para ayudar a detectarlas, sin ser de mucha ayuda.

Tabla 9. Distribución de las mutaciones en el gen *inhA* de los 160 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* estudiados (130 con fenotipo MDR y 30 con fenotipo susceptible).

Codón	Cambio nucleótido	Cambio en aminoácido	N° aislamientos
42	CCG/ <u>ACG</u>	Pro-Thr	2
56	GGC/ <u>GTT</u>	Gly-Val	1
	GGC/ <u>GGT</u>	Gly-Gly	1
94	TCG/ <u>GCG</u>	Ser-Ala	3
Ins 213 C	Ins 213 C 640-641		1
218	GAG/ <u>TAG</u>	Glu-Stop	1
220	Ins 213 G 662-663		1
235	CTA/ <u>CGA</u>	Leu-Arg	3
251	Ins 213 G 754-755		1
268	GAC/ <u>TAC</u>	Asp-Tyr	1
Sin mutación			136
Sin Dato			14
Total			160

6.9.4 Secuenciación del fragmento de 490 pb del gen *ahpC*

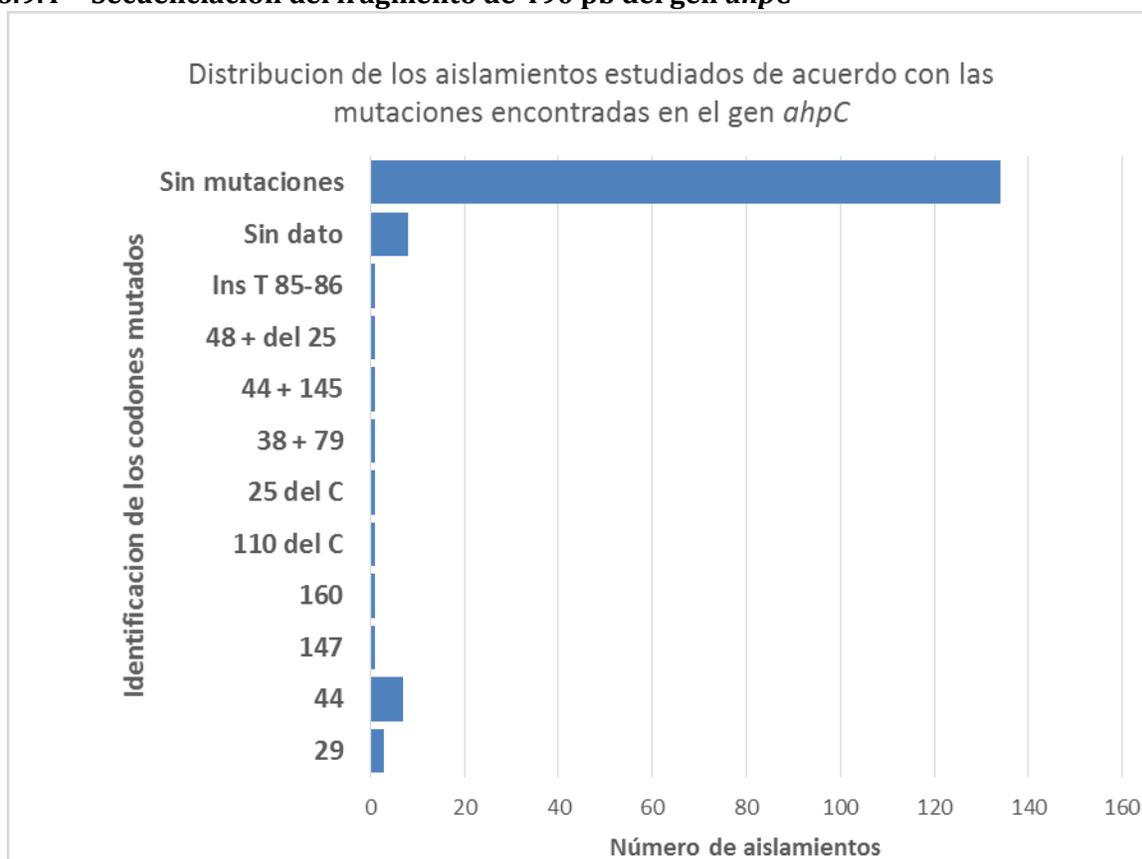


Figura 12. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *ahpC*.

Tabla 10. Distribución de las mutaciones en el gen *ahpC* de los 160 aislamientos clínicos de *M tuberculosis* estudiados (130 con fenotipo MDR y 30 con fenotipo susceptible).

Codón	Cambio nucleótido	Cambio en aminoácido	N° aislamientos
25 Del A	AAG/ A G	Lys- Δ AG	2
28 Ins T	Ins T 85-86		1
29	AAG/TAG	Lys-Stop	3
37 Del C	Del C 110		1
38	ATC/AAC	Leu-Asn	1
44	CCA/C G A	Pro-Arg	8
48	CGG/C G C	Arg-Arg	1
79	GAC/C A C	Asp-His	1
145	CAG/C A T	Gln-His	1
147	GTC/T C C	Val-Ser	1
160	GAC/G A T	Asp-Asp	1
Sin mutación			134
Sin Dato			8
Total			160

Entre los 160 aislamientos estudiados, 134 de ellos no presentaron mutaciones en la región de 490 pb del gen *ahpC* estudiada. Entre los restantes, 18 aislamientos presentaron mutaciones y todos correspondían a aislamientos MDR.

La mutación más frecuente entre las pocas encontradas fue en el codón 44, previamente reportada entre los aislamientos colombianos.

Tan solo tres de los aislamientos resistentes a isoniazida que presentaron mutación en el gen *ahpC*, no tenía mutación en *katG* y por lo tanto serviría para ayudar a detectarlas, sin ser de mucha ayuda.

En el gen *ahpC*, fueron encontrados 11 genotipos mutantes, en los aislamientos secuenciados, de los cuales 2 son mutaciones sinónimas y uno produce codón de parada.

6.9.5 Secuenciación del fragmento de 322 pb del gen *gyrA*

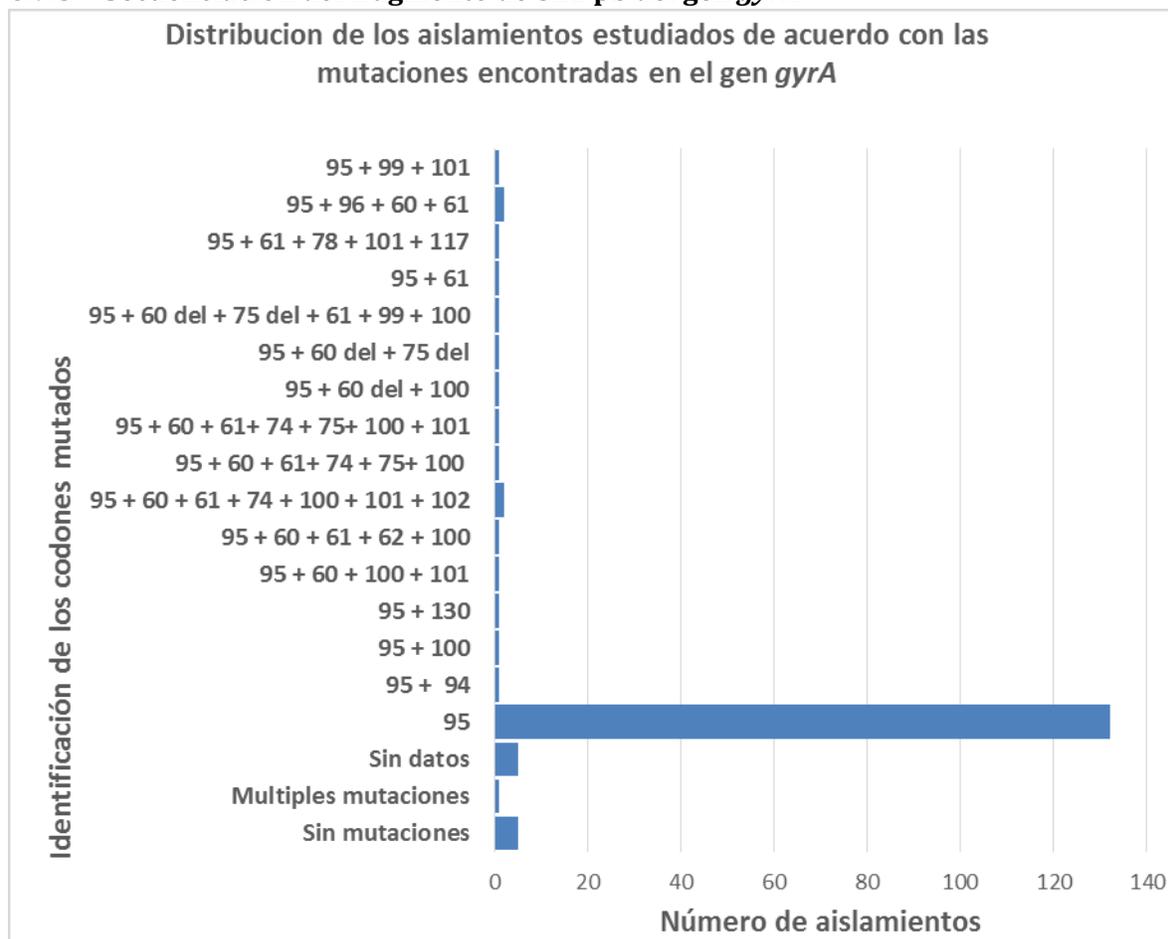


Figura 13. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *gyrA*.

Como se muestra en la Figura 13, los aislamientos colombianos presentaron hasta siete mutaciones simultáneas en el fragmento de 322 pb del gen *gyrA* amplificado y secuenciado.

Entre los 160 aislamientos estudiados, tanto los pansusceptibles (30) como los MDR, casi todos (94%), presentaron mutación en el codón 95, la cual representa un marcador filogenético o filogeográfico de los aislamientos colombianos, que no se podría implicar en resistencia a fluoroquinolonas. Se encontraron mutaciones en 16 codones con 39 diferentes presentaciones alélicas donde 7 corresponden a mutaciones sinónimas y 2 generan codón de parada (Tabla 11).

Es importante resaltar que tan solo 1 aislamiento MDR mostro mutación en el codón 94 fuertemente implicado en resistencia a fluoroquinolonas, además 2 aislamientos MDR presentaron mutaciones en el codón 96 posiblemente asociado a resistencia.

Por otra parte, como se muestra en la Figura 14, en los aislamientos colombianos se evidenciaron tres sitios calientes para mutaciones que pueden estar asociadas con resistencia a fluoroquinolonas puesto que varios generan codones de parada y tan solo algunas de ellas son sinónimas (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución de las mutaciones en el gen *gyrA* de los 160 aislamientos clínicos de *M tuberculosis* estudiados (130 con fenotipo MDR y 30 con fenotipo susceptible).

Codón	Cambio nucleótido	Cambio en aminoácido	N° aislamientos
60	TTC/TTA	Phe-Leu	2
	TTC/TAA	Phe-Stop	2
	TTC/ATC	Phe-Ile	1
	TTC/GGG	Phe-Gly	1
	TTC/TCC	Phe-Ser	1
Del 60 T	TTC/TAC	Phe-ΔTC	4
61	GAT/GCG	Asp-Ala	1
	GAT/GCC	Asp-Asp	2
	GAT/AAT	Asp-Asn	1
	GAT/AAA	Asp-Lys	3
	GAT/GAA	Asp-Glu	3
Del T 61	GAT/GAΔ	Asp-GAΔ	1
62	TCC/TGC	Ser-Ser	1
74	GCC/GCT	Ala-Ala	4
	GCC/CTC	Ala-Leu	1
75	CGG/CCG	Arg-Pro	1
Del C 75	CGG/ΔTG	Arg-ΔTG	3
76	TCG/GCG	Ser-Ala	1
78	GAG/GAA	Glu-Glu	1
94	GAC/TAC	Asp-Tyr	1
95	AGC/ACC	Ser-Thr	150
96	CTG/TTG	Leu-Leu	2
99	ATG/ATT	Met-Leu	3
100	GCC/TCC	Ala-Ser	2
	GCC/GCT	Ala-Ala	3
	GCC/CTC	Ala-Leu	2
	GCC/GTC	Ala-Val	1
	GCC/TTT	Ala-Phe	1
	GCC/CCC	Ala-Pro	1
	CAG/CCA	Gln-Pro	1
101	CAG/AGA	Gln-Arg	2
	CAG/CTA	Gln-Leu	1
	CAG/CAA	Gln-Gln	1
	CAG/TAG	Gln-Stop	1
	CAG/CAC	Gln-His	1
102	CCC/AAC	Pro-Thr	2
	CCC/GGG	Pro-Gly	1
117	GGC/TGC	Gly-Cys	1
130	ACC/AAC	Thr-Asn	1
Sin mutación			5
Sin Dato			5
Total			160

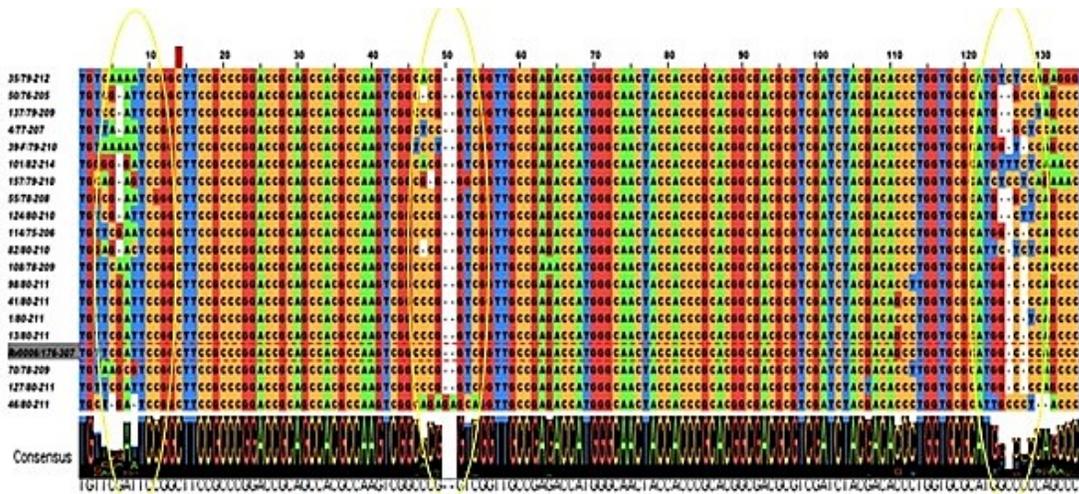


Figura 14. Presencia de tres sitios calientes para mutaciones en el gen *gyrA* encontradas en los aislamientos colombianos estudiados

Las mutaciones en este gen son las que generan los denominados aislamientos pre-XDR y por lo tanto son importantes desde el punto de vista epidemiológico.

6.9.6 Secuenciación del fragmento de 789 pb del gen *tlyA*

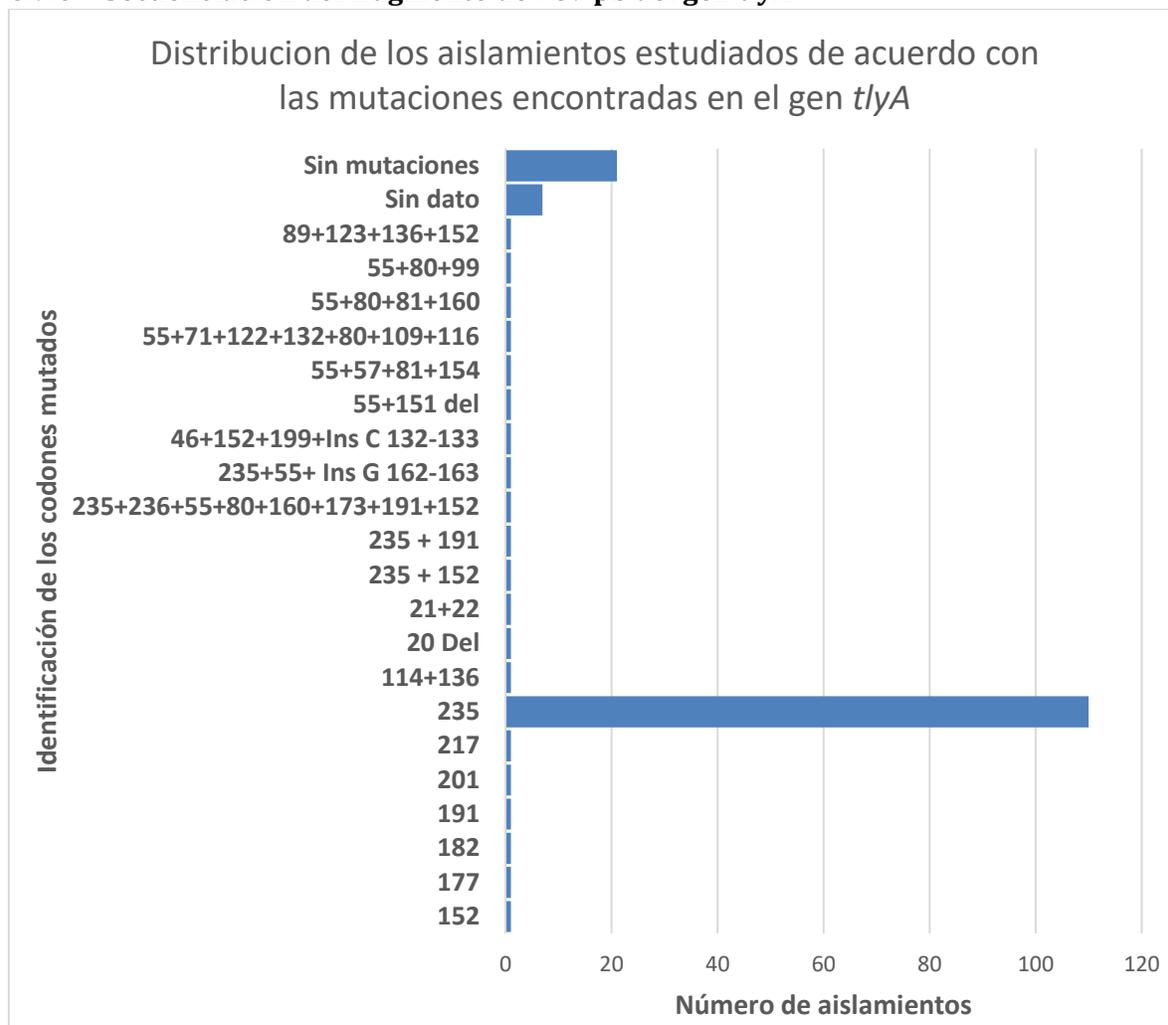


Figura 15. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *tlyA*

Como se muestra en la Figura 15, los aislamientos colombianos mostraron hasta ocho mutaciones simultáneas en el fragmento de 789 pb del gen *tlyA* amplificado y secuenciado.

Entre los 160 aislamientos estudiados, 21 de ellos no presentaron mutaciones en la región estudiada. Tanto entre los aislamientos pansusceptibles (30) como entre los MDR, la gran mayoría (75%), presentaron mutación en el codón 235, que es una mutación sinónima, la cual representa un marcador filogenético o filogeográfico de los aislamientos colombianos, que no se podría implicar en resistencia a amikacina, kanamicina o capreomicina.

En este gen se observaron mutaciones en 33 codones, con 40 presentaciones alélicas diferentes, donde 7 de estos genotipos representan mutaciones sinónimas y solamente 7 codones presentaron mutación única en los aislamientos estudiados (Tabla 12).

Tabla 12 Distribución de las mutaciones en el gen *tlyA*, de los 160 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* estudiados (130 con fenotipo MDR y 30 con fenotipo susceptibles).

Codón	Cambio nucleótido	Cambio en aminoácido	N° aislamientos
20	CGT/CGC	Arg-Arg	1
20 Del T	CGT/CGΔ	Arg-CGΔ	2
21	CAA/CCA	Gln-Pro	1
22	CAG/CCG	Gln-Pro	1
44 Ins C			1
46	GTG/GGG	Val-Lys	1
51	GCG/GGC	Ala-Gly	1
54 Ins G			1
	GTG/TTT	Val-Phe	2
	GTG/GCG	Val-Ala	1
55	GTG/TTG	Val-Leu	1
	GTG/CCG	Val-Pro	1
	GTG/GTT	Val-Val	2
57	GAC/AAA	Asp-Lys	1
71	GTC/TTC	Val-Phe	1
	GCG/GCT	Ala-Ala	3
80	GCG/CCG	Ala-Pro	1
	GTG/TTT	Val-Phe	1
81	GGT/GCG	Val-Ala	1
89	GCG/ACG	Ala-Thr	1
99	GAT/TTA	Val-Leu	1
109	GGT/GTT	Gly-Val	1
114	CGG/CIG	Arg-Leu	1
116	CGG/CIG	Arg-Leu	1
122	GCT/TIT	Ala-Phe	1
123	GCG/GCC	Ala-Ala	1
132	CGC/CIC	Arg-Leu	9
136	CGC/CIC	Arg-Leu	1
151	AGT/AAT	Ser-AAT	1
	AGT/ATT	Ser-Leu	1
152	AGT/ATT	Ser-Ile	5
154	CGA/CAA	Arg-Gln	1
160	GTT/ITT	Val-Phe	2
173	GCG/TGG	Ala-Ser	1
177	CCA/TCA	Pro-Ser	1
182	GCA/GCT	Ala-Ala	1
191	GGT/TGT	Gly-Cys	3
199	GAC/GAT	Asp-Asp	1
217	GAG/GAT	Glu-Asp	1
	AAT/AAC	Asn-Asn	112
235	AAT/ATT	Asn-Ile	2
236	GTC/GCG	Leu-Ser	1
Sin mutación			21
Sin Dato			7
Total			160

6.9.7 Secuenciación del fragmento de 1404 pb del gen *rrs*

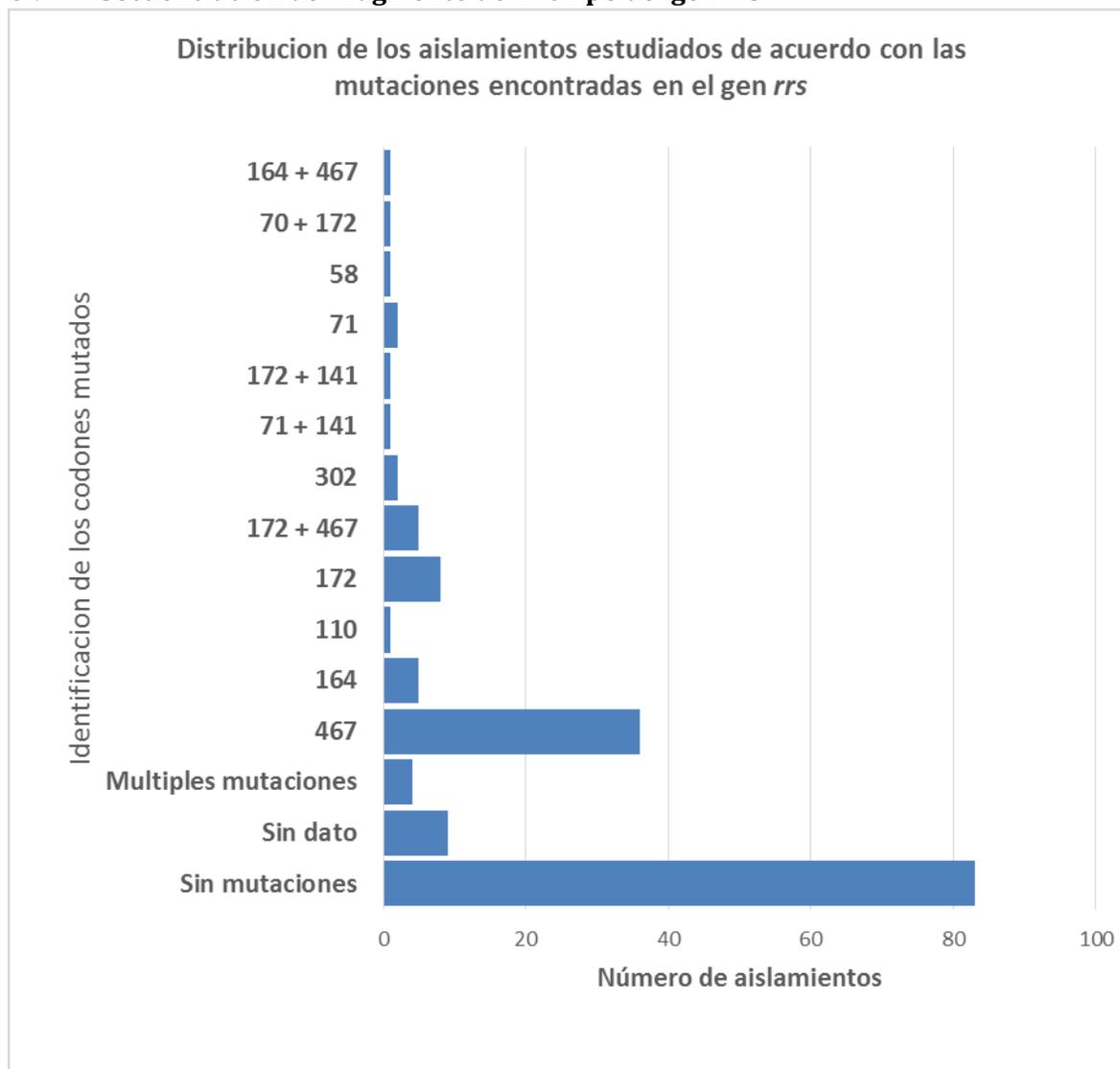


Figura 16. Distribución de los aislamientos estudiados de acuerdo con las mutaciones encontradas en el gen *rrs*.

Como se muestra en la Figura 16, los aislamientos colombianos presentaron hasta 2 mutaciones simultáneas en el fragmento de 1404 pb del gen *rrs* amplificado y secuenciado.

Entre los 160 aislamientos estudiados, tanto los pansusceptibles (30) como los MDR, una gran proporción (58%) no presentó mutación en el fragmento de 1404 pb del gen *rrs* amplificado y secuenciado.

El codón 467 presentó la mayor cantidad de mutaciones con 8 genotipos diferentes, el cual en los diferentes estudios realizados a nivel mundial, ha sido fuertemente implicado en resistencia a amikacina, kanamicina y capreomicina.

En este gen se observaron mutaciones en 8 codones, con 19 presentaciones alélicas diferentes, donde 5 de estos genotipos representan mutaciones sinónimas (Tabla 13).

Tabla 13. Distribución de las mutaciones en el gen *rrs*, de los 160 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* estudiados (130 con fenotipo MDR y 30 con fenotipo susceptible)

Codón	Cambio nucleótido	Cambio en aminoácido	N° aislamientos
58	CGG/CGA	Arg-Arg	1
70	AGC/AGG	Ser-Arg	1
71	GCT/GCA	Ala-Ala	2
	GCT/TGC	Ala-Cys	1
110	ACG/ACA	Thr-Thr	1
141	CGG/CGT	Arg-Arg	2
164	GCG/GTG	Ala-Val	7
172	AGC/CGC	Ser-Arg	8
	AGC/CTC	Ser-Leu	1
	AGC/TGC	Ser-Cys	2
	AGC/ATC	Ser-Ile	3
467	TCA/TAT	Ser-Tyr	16
	TCA/TTA	Ser-Leu	2
	TCA/TCG	Ser-Ser	10
	TCA/CAA	Ser-Gln	2
	TCA/TGC	Ser-Cys	1
	TCA/TGA	Ser-Stop	3
	TCA/TAA	Ser-Stop	2
	TCA/TAG	Ser-Stop	6
Sin mutación			83
Sin Dato			9
Total			160

6.10 Resultados de la secuenciación en relación con los espoligotipos.

6.10.1 Familia Beijing

En general, los 20 aislamientos de la familia Beijing incluidos en el estudio tenían una mutación específica en *rpoB* (S531L), en *katG* (S315T) y en *gyrA* (S95T); el 50% en *rrs* (S467S, S467T, S467stop) y el 65% en *tlyA* (N235N), lo cual demuestra la clonalidad de los aislamientos de este linaje que además provienen de un solo municipio del país.

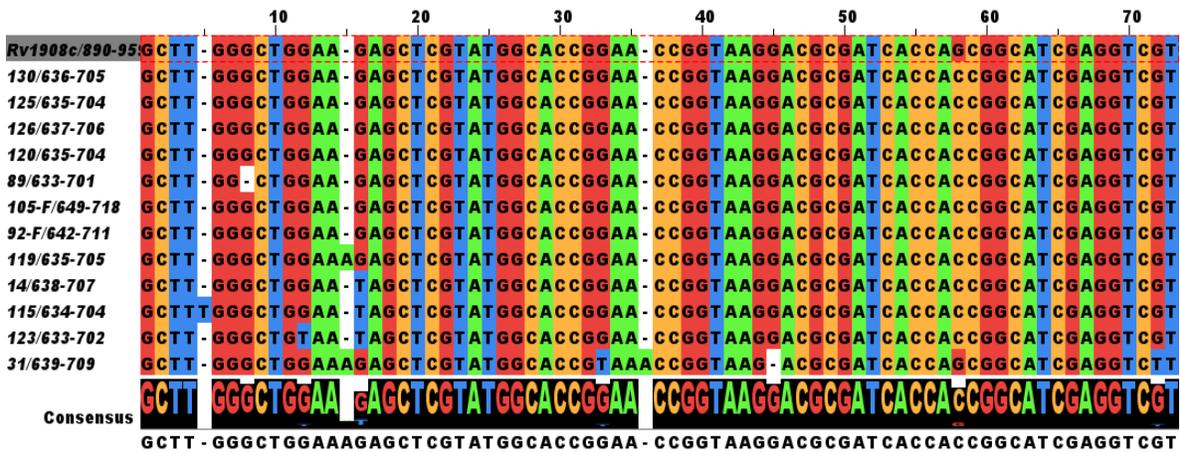


Figura 17. Mutaciones en *katG* de los aislamientos Beijing.

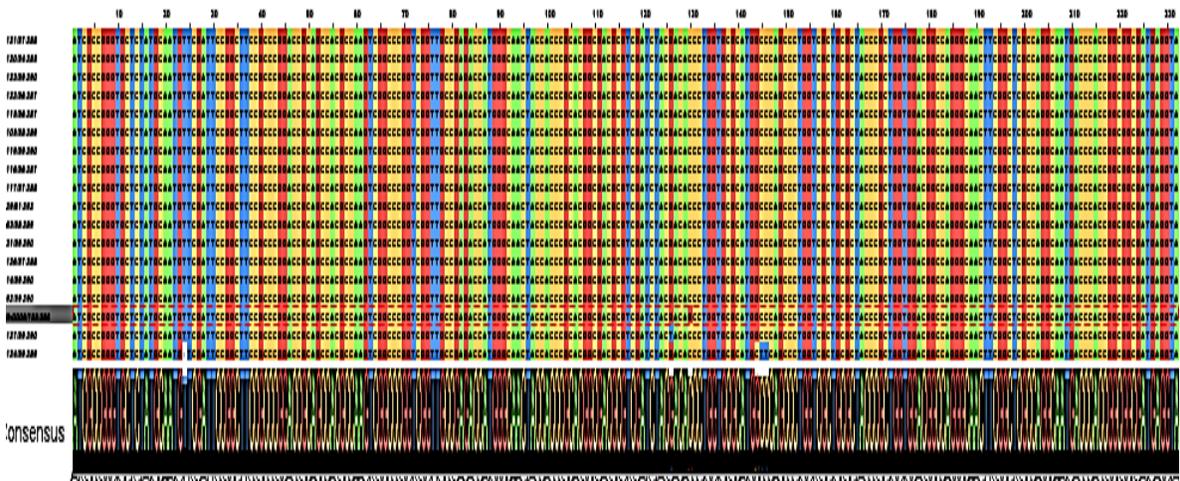


Figura 18. Evidencia de mutaciones en el gen *gyrA* de los aislamientos Beijing colombianos.

Los aislamientos de la familia Beijing reivindicaron la posible asociación de las mutaciones en los sitios calientes de *gyrA* (localizados uno cerca al codón 60, otro cerca al 75 y el ultimo cerca del codón 101) (Figura 14) detectadas en el presente estudio, con la resistencia a fluoroquinolonas.

6.10.2 Familia LAM

Los 57 aislamientos de la familia LAM mostraron alta frecuencia de aislamientos sin mutaciones en *rpoB* (26,3%), en *katG* (40.4%) y en *rrs* (49,2%), aunque eran en su gran mayoría (84,2%) de fenotipo resistente a los medicamentos. Esta ausencia de mutaciones explica en parte porque este linaje es tan exitoso en la población colombiana.

6.10.3 Familia Haarlem

Entre los 32 aislamientos de la familia Haarlem incluidos en el estudio, de los cuales 7 eran pansusceptibles, el 21.9% no tenían mutaciones en el gen *rpoB* ni 18,8% en *tlyA*, mientras que el 34,4% y el 59,4% no tiene mutaciones en los genes *katG* y *rrs* respectivamente.

6.10.4 Familia U

Entre los 13 aislamientos de la familia U. incluidos en el estudio encontramos que el 53.8% no tiene mutaciones en el gen *rrs* y que 7.2% de los aislamientos presentó la mutación N235N en el gen *tlyA*.

6.10.5 Espoligotipos no reportados (huérfano)

Entre los 26 aislamientos huérfanos incluidos en el estudio encontramos, que presentan gran variabilidad en cuanto a su perfil de mutaciones en los genes estudiados similar a lo observado en su variabilidad de patrones de spoligotyping.

6.11 Distribución de los aislamientos con fenotipo sensible o resistente a los medicamentos según la presencia o ausencia de mutaciones.

Con miras a cumplir nuestro objetivo de identificar las mutaciones propias de los aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* asociadas con fenotipos MDR en los genes *rpoB*, *KatG*, *inhA* y *ahpC*, pudimos detectar que en los aislamientos colombianos estudiados, las mutaciones en *rpoB* presentan una sensibilidad del 90,8% y una especificidad del 96,7%. Para el gen *katG*, las mutaciones presentan una sensibilidad del 77,1% y una especificidad del 92,6%. Para el gen *inhA*, las mutaciones presentan una sensibilidad del 7,4% y una especificidad del 96%. Para el gen *ahpC*, las mutaciones presentan una sensibilidad del 9,6% y una especificidad del 78,6%.(Tabla 14).

Tabla 14. Distribución de los aislamientos estudiados estratificados según fenotipo de resistencia a los medicamentos y presencia de mutaciones.

MEDICAMENTO	GEN ESTUDIADO	FENOTIPO RESISTENTE		FENOTIPO SENSIBLE	
		CON MUTACIÓN n (%)	SIN MUTACION n (%)	CON MUTACION n (%)	SIN MUTACION n (%)
Rifampicina	<i>rpoB</i>	118(90,8)	12(9,2)	1(3,3)	29(96,7)
	<i>katG</i>	84(77,1)	25(22,9)	2(7,4)	25(92,6)
	<i>inhA</i>	9(7,4)	112(92,6)	1(4,0)	24(96,0)
	<i>ahpC</i>	12(9,6)	113(90,4)	6(21,4)	22(78,6)
Isoniazida	<i>katG+inhA</i>	86(66,2)	44(33,8)	3(13,0)	20(87,0)
	<i>katG+ahpC</i>	89(68,5)	41(31,5)	8(28,6)	20(71,4)
	<i>InhA+ahpC</i>	21(16,2)	109(83,8)	7(28,0)	18(72,0)
	<i>katG+inhA+ahpC</i>	91(70,0)	39(30,0)	9(39,1)	14(60,9)
Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>	123(97,6)	3(2,4)	27(93,1)	2(6,9)
	<i>gyrA</i> implicado	16(12,7)	110(87,3)	3(10,3)	26(89,7)
Kanamicina Amikacina Capreomicina	<i>rrs</i>	63(52,1)	58(47,9)	5(16,7)	25(83,3)
	<i>tlyA</i>	110(88,0)	15(12,0)	4(14,3)	24(85,7)
	<i>rrs+tlyA</i>	72(55,4)	58(44,6)	9(31,0)	20(69,0)
Rifampicina + Isoniazida	<i>rpoB+katG+inhA+ahpC</i>	123(94,6)	7(5,4)	0(0)	30(100)
Fluoroquinolonas + Kanamicina + Amikacina + Capreomicina	<i>gyrA+rrs+tlyA</i>	11 (8,5)	119(91,5)	0(0)	30 (100)

Cuando combinamos los resultados de los genes que estudiamos para resistencia a rifampicina con isoniazida, encontramos que las mutaciones en *rpoB+katG+inhA+ahpC* presentan una sensibilidad conjunta del 94,6% y una especificidad del 100% (Tabla 14).

En lo referente a la Identificación de las mutaciones propias de los aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* asociadas con fenotipos XDR en los genes *gyrA*, *rrs* y *tlyA*; encontramos que las mutaciones en *gyrA*, sin tener en cuenta el marcador filogenético, presenta una sensibilidad del 12,7% y una especificidad del 89,7%. En el gen *rrs*, las mutaciones presentan una sensibilidad del 52,1% y una especificidad del 83,3%. En el gen *tlyA* las mutaciones presentan una sensibilidad del 88% y una especificidad del 85,7%. (Tabla 14).

Cuando combinamos los resultados de los genes que estudiamos para resistencia a fluoroquinolonas con resistencia a kanamicina, amikacina y capreomicina, encontramos que las mutaciones en *gyrA+rrs+tlyA* presentan una sensibilidad conjunta del 8,5% y una especificidad del 100% (Tabla 14).

Con respecto a la identificación de las mutaciones que puedan predecir la presencia de fenotipos MDR en los aislamientos colombianos, encontramos que existen varias de ellas que nos servirían para tal efecto, las cuales podemos ver en la Tabla 15.

Teniendo en cuenta que el 9,2% y el 22,9% de los aislamientos colombianos no presentan mutaciones en el en *rpoB* y *katG* es necesario investigar otros mecanismos que induzcan la resistencia a estos medicamentos, diferente al de las mutaciones en el blanco molecular.

Con respecto a la identificación de las mutaciones que puedan predecir la presencia de fenotipos XDR en los aislamientos colombianos, encontramos que existen varias de ellas que nos servirían para tal efecto, las cuales podemos ver en la Tabla 16.

Tabla 15. Descripción de las mutaciones predictoras de fenotipos MDR entre los aislamientos colombianos.

Medicamento	Gen estudiado	Codón	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Aislamientos captados			
Rifampicina	<i>rpoB</i>	479	ATG/ATA	Met-Ile	90,20%			
			ATG/AAG	Met-Lys				
			AGC/AGA	Ser-Arg				
		511	CTG/CCG	Leu-Pro				
		513	CAA/GAA	Gln-Glu				
			CAA/CCA	Gln-Pro				
		515	ATG/GTG	Met-Val				
			ATG/ATT	Met-Ile				
		516	GAC/GTC	Asp-Val				
		522	TCG/TTG	Ser-Leu				
		525	ACC/CAC	Thr-His				
			CAC/CAA	His-Gln				
			CAC/GAC	His-Asp				
			CAC/TGC	His-Cys				
			CAC/AAC	His-Asn				
			CAC/GGC	His-Gly				
			CAC/CTC	His-Leu				
			CAC/TAC	His-Tyr				
			528	CGC/CCC		Arg-Pro		
			TCG/TTT	Ser-Phe				
		531	TCG/TTG	Ser-Leu				
			TCG/TGG	Ser-Trp				
		538	CTG/CCG	Leu-Pro				
		550	GTG/GCG	Val-Ala				
		582	AAC/TAC	Asn-Tyr				
		588	GAA/TAA	Glu-Stop				
			GAA/AAA	Glu-Lys				
		592	CGC/GGC	Arg-Gly				
		600	AGC/ACC	Ser-Thr				
		Isoniazida	<i>katG</i>	138		AAC/CAC	Asn-His	63.9%
						AAG/CTC	Lys-Leu	
						AAG/AAA	Lys-Lys	
				153		AAG/AAT	Lys-Asn	
AAG/CAC	Lys-His							
AAG/CCT	Lys-Pro							
AGG/ACT	Lys-Thr							
AAG/TTC	Lys-Phe							
154	AAG/CCT			Lys-Pro				
184	GGC/GTC			Gly-Val				
189	GAC/AAC			Asp-Asn				
191	TGG/TTT			Trp-Phe				
192	TGG/TGT			Trp-Cys				
192	GAG/TAG			Glu-Tyr				
259	GTC/CTC			Val-Leu				
260	GTC/CTC			Val-Leu				
	AGC/AAC			Ser-Asn				
315	AGC/ACC	Ser-Thr						
	AGC/ACA	Ser-Thr						
	AGC/ATC	Ser-Ile						
316	GGC/AGC	Gly-Ser						

Tabla 16 Descripción de las mutaciones predictoras de fenotipos XDR entre los aislamientos colombianos.

Medicamento	Gen estudiado	Codón	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Aislamientos	
Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>	60	TTC/TTA	Phe-Leu	100,00%	
			TTC/TAA	Phe-Stop		
			TTC/ATC	Phe-Ile		
			TTC/GGG	Phe-Gly		
		61	TTC/TCC	Phe-Ser		
			GAT/GCG	Asp-Ala		
			GAT/AAT	Asp-Asn		
			GAT/AAA	Asp-Lys		
			GAT/GAA	Asp-Glu		
		74	GCC/CTC	Ala-Leu		
		75	CGG/CCG	Arg-Pro		
		76	TCG/GCG	Ser-Ala		
		94	GAC/TAC	Asp-Tyr		
		99	ATG/ATT	Met-Leu		
		100	GCC/TCC	Ala-Ser		
			GCC/CTC	Ala-Leu		
			GCC/GTC	Ala-Val		
			GCC/TTT	Ala-Phe		
			GCC/CCC	Ala-Pro		
			CAG/CCA	Gln-Pro		
			101	CAG/AGA		Gln-Arg
				CAG/CTA		Gln-Leu
				CAG/TAG		Gln-Stop
			102	CAG/CAC		Gln-His
		CCC/AAC		Pro-Thr		
		117	CCC/GGG	Pro-Gly		
		130	GGC/TGC	Gly-Cys		
		rrs	70	ACC/AAC		Thr-Asn
			71	AGC/AGG		Ser-Arg
				GCT/TGC		Ala-Cys
			164	GCG/GTG		Ala-Val
				AGC/CGC		Ser-Arg
			172	AGC/CTC		Ser-Leu
AGC/TGC	Ser-Cys					
AGC/ATC	Ser-Ile					
467	TCA/TAT		Ser-Tyr			
	TCA/TTA		Ser-Leu			
	TCA/CAA		Ser-Gln			
	TCA/TGC		Ser-Cys			
	TCA/TGA		Ser-Stop			
	TCA/TAA	Ser-Stop				
	TCA/TAG	Ser-Stop				
21	CAA/CCA	Gln-Pro				
22	CAG/CCG	Gln-Pro				
46	GTG/GGG	Val-Lys				
55	GTG/TTT	Val-Phe				
	GTG/GCG	Val-Ala				
	GTG/TTG	Val-Leu				
	GTG/CCG	Val-Pro				
71	GTC/TTC	Val-Phe				
80	GCG/CCG	Ala-Pro				
81	GTG/TTT	Val-Phe				
89	GGT/GCG	Val-Ala				
	GCG/ACG	Ala-Thr				
99	GAT/TTA	Val-Leu				
109	GGT/GTT	Gly-Val				
116	CGG/CTG	Arg-Leu				
122	GCT/TTT	Ala-Phe				
132	CGC/CTC	Arg-Leu				
136	CGC/CTC	Arg-Leu				
152	AGT/ATT	Ser-Leu				
	AGT/ATT	Ser-Ile				
154	CGA/CAA	Arg-Gln				
160	GTT/TTT	Val-Phe				
173	GCG/TGG	Ala-Ser				
177	CCA/TCA	Pro-Ser				
191	GGT/TGT	Gly-Cys				
217	GAG/GAT	Glu-Asp				
236	GTC/GCG	Leu-Ser				
Kanamicina / Amikacina/ Capreomicina	<i>tlyA</i>	217	GAG/GAT	Glu-Asp	100%	
			GTC/GCG	Leu-Ser		

Teniendo en cuenta que entre los aislamientos colombianos MDR, la proporción de aislamientos XDR es tan solo del 10% (8,2-12,4%), con la investigación de las mutaciones en los genes *gyrA*, *rrs* y *tlyA* (Tabla 16), se podría predecir la presencia de aislamientos XDR.

7 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó un análisis detallado de los aislamientos de *M. tuberculosis* MDR provenientes de pacientes colombianos, recolectados entre 1999 y 2009, en el que se secuenciaron siete blancos moleculares implicados en la resistencia del *M. tuberculosis* a los medicamentos de primera y segunda línea, se constituye en el primero de este tipo que se realiza en el país, cuya fortaleza principal es el alto número de aislamientos incluidos y secuenciados, así como la inclusión de un buen número de controles sensibles a los medicamentos por lo que lo descrito aquí puede dar luces para el manejo de los casos con tuberculosis MDR/XDR en Colombia.

Los 160 aislamientos estudiados mostraron una gran diversidad genotípica, basada en sus patrones de *spoligotyping*, (Tabla 3), lo cual sugiere que los aislamientos son epidemiológicamente no relacionados y que estuvieron bajo diferentes condiciones de presión selectiva. Es decir, estos aislamientos emergieron de eventos independientes de adquisición de resistencia a los medicamentos, principalmente dada por fallas individuales del tratamiento como son la incorrecta prescripción o dosificación y la falta de adherencia al esquema, el abandono de la medicación y el inadecuado monitoreo, entre otros. Desde el punto de vista de la transmisión, estos aislamientos adquieren un papel importante que va en aumento.

Teniendo en cuenta que los aislamientos estudiados se recolectaron dentro del programa de vigilancia de la resistencia que se realiza en el país, en un periodo de 10 años, los 130 aislamientos MDR, incluidos representan realmente la presencia y la distribución geográfica observa en Colombia.

A nivel mundial se ha aceptado que es muy importante poder determinar de manera rápida la resistencia a rifampicina puesto que casi todos los aislamientos resistentes a rifampicina muestran resistencia a otros medicamentos, en especial a la isoniazida. Por dicha razón y porque el mecanismo molecular de resistencia a rifampicina es el más ampliamente conocido actualmente, desde hace varios años se propuso como marcador molecular para detección de aislamientos MDR.

A pesar de que los estudios del gen *rpoB* han reportado que las mutaciones en la región RRDR ocurren en más del 95% de los aislamientos resistentes a rifampicina (Tabla 17), en el presente estudio encontramos que el 9,2% de los aislamientos MDR no presentaron mutaciones. Tan solo el 87% de los aislamientos MDR tenían mutaciones en la región RRDR y el 6% exclusivamente fuera de esta, hallazgo que permite corroborar las variaciones de las mutaciones en relación con el origen geográfico de los aislamientos (5).

Por otra parte, el 11% de los aislamientos MDR estudiados portan mutaciones en codones corriente abajo de la zona RRDR (Figura 7) y el 15% de ellos contienen mutaciones en codones corriente arriba de esta zona (Figura 8).

Debido a que en la mayoría de los casos se presentaron simultáneamente, aun no es claro si tales mutaciones representan mutaciones compensatorias o si están realmente causando resistencia a la acción de la rifampicina; descontando que 7 corresponden a mutaciones sinónimas (Tabla 7).

Tabla 17. Mutaciones más frecuentes asociadas con resistencia a medicamentos en *M. tuberculosis*, basada en la información del TBDRreamDB (<http://www.tbdreamdb.com>)

Medicamento	Gen	Proteína que codifica	Codones	Mutaciones Frecuencia %
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Subunidad β de la RNA polimerasa	516	95
			526	
			531	
Isoniazida	<i>ahpC</i>	Alkyl hidroperóxido reductasa	-46 -39	3.1-10
	<i>inhA</i>	Enoil reductasa	94 95	0-9
	<i>KatG</i>	Catalasa/peroxidasa	315	22-91
Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>	DNA girasa	90	75-94
			91	
			94	
Kanamicina/amikacina/ Capreomicina	<i>rrs</i>	rRNA 16s	1401	0-92
			1402	
			1408	
	<i>tlyA</i>	rRNA metiltransferasa (2'-O-metil-tranfersa)	*Varios	88-99

*Indica mutaciones en todo el gen con baja frecuencia

En lo referente al gen *rpoB*, en los aislamientos colombianos MDR encontramos las mutaciones ya descritas en proporciones similares a las reportadas, siendo S531L, la más frecuente y además encontramos 6 mutaciones no reportadas previamente (D435V, V477M, E588K, S600T, I603S, V662F) las cuales podrían conferirles resistencia a rifampicina porque a pesar de estar fuera de RRDR, no son sinónimas ni fueron encontradas combinadas con otras ya reportadas como causantes de resistencia a rifampicina.

Entre los 130 aislamientos MDR, un alto porcentaje de ellos (44,6%) presentaron la mutación S315T en el gen *katG*, mutación que se ha reportado que ocurre a diferentes tasas en los diferentes países correlacionándose con la prevalencia de tuberculosis de estos. Por ejemplo esta mutación en países de alta prevalencia como Rusia, Vietnam y la India son del 91%, 71% y 59% respectivamente, mientras que países de baja prevalencia como Japón y Singapur esta mutación es del 22% y 23% respectivamente (69).

Por otra parte, en los aislamientos MDR colombianos encontramos otras mutaciones en el codón 315 (S315N, S315I) y además, el 28% de estos aislamientos MDR portan mutaciones en codones

diferentes al 315, los cuales también pasarían desapercibidas por los métodos comerciales, puesto que la secuenciación mostró 25 codones con mutaciones representadas en 37 diferentes genotipos (Tablas 8 y 17).

En el presente estudio se encontró alta proporción de aislamientos con mutación en el codón 153, (12%) que podría causar la resistencia a isoniazida en los aislamientos colombianos.

El fragmento del gen *ahpC* secuenciado detectó tres aislamientos resistentes a isoniazida que no tenía mutación en *katG* y por lo tanto confirmamos lo sugerido previamente por Hazbon *et al*, en el sentido de que la contribución de este blanco molecular como marcador de resistencia a isoniazida en términos prácticos sería modesta. (55) (Tabla 17).

En el presente estudio el fragmento del gen *inhA* en los aislamientos secuenciados mostró un comportamiento similar al del gen *ahpC* pues solo uno de los 10 aislamientos que presentaron mutaciones, no la tenían en el gen *katG* y por lo tanto no es un buen marcador de aislamientos resistentes a isoniazida.

Ya que los mecanismos de resistencia en *M. tuberculosis* son complicados, especialmente en lo referente a isoniazida, podría haber más genes implicados en la resistencia a este medicamento, que deberían ser estudiados para llegar al completo entendimiento de este evento.

En lo referente al estudio de los blancos moleculares para detección de resistencia a medicamentos de segunda línea: *gyrA*, *tlyA* y *rrs*, nuestros resultados son los primeros que se realizan en el país y los únicos con un número grande de aislamientos MDR, por lo tanto son de gran valor en el contexto de la salud pública y de la resistencia a los medicamentos.

En el gen *gyrA*, se han descrito mutaciones en el codón 95, las cuales generalmente se presentan como S95T, esta mutación se encontró en los aislamientos colombianos en una alta proporción (94%), igual a lo reportado en aislamientos de Venezuela (70) y de China (69) que se presenta tanto en aislamientos resistentes como susceptibles a las fluoroquinolonas, por lo tanto no se encuentra asociada con resistencia a estos medicamentos (71).

Por otra parte, es muy interesante haber encontrado que entre nuestros aislamientos, la mutación en el codón 94, fuertemente asociada con resistencia a fluoroquinolonas, es exótica porque solo 1 aislamiento la presentó pero en cambio, detectamos tres sitios calientes para mutaciones en los aislamientos colombianos localizados uno cerca al codón 60, otro cerca al 75 y el último cerca del codón 101 (Figura 14). Mutaciones en estos sitios han sido reportadas pero hasta la fecha los pocos estudios existentes (en aislamientos diferentes a los colombianos), no han permitido establecer claras asociaciones. (69).

Teniendo en cuenta que mutaciones de resistencia a fluoroquinolonas en los aislamientos MDR, son marcadores de aislamientos pre-XDR, nuestros hallazgos en *gyrA* (12,8% con mutaciones), cobran gran importancia en el contexto nacional, por lo cual deben ser vigilados y estudiados más profundamente.

Los genes *tlyA* y *rrs* han sido menos estudiados que *gyrA*, por lo tanto nuestros hallazgos son novedosos y permiten aseverar que hace falta realizar más estudios al respecto para dilucidar su contribución real en la detección de aislamientos XDR.

Ya que la kanamicina y la amikacina son antibióticos de la misma clase y estructura molecular, comparten el blanco molecular y se puede asumir que existe resistencia cruzada entre ellos, sin embargo, se ha demostrado en estudios recientes que la resistencia cruzada no es absoluta, y que existe alta variabilidad entre niveles de resistencia de uno y otro antibiótico, lo que ha permitido pensar que pueden existir otro cambio molecular adicional relacionado con la resistencia (72).

Para el gen *tlyA* en los aislamientos colombianos encontramos una gran proporción (75%), con mutación en el codón 235, (A235A) que es una mutación sinónima, la cual representa un marcador filogenético o filogeográfico de los aislamientos colombianos, no implicada en resistencia a amikacina, kanamicina o capreomicina, pero muy importante desde el punto de vista de la salud pública porque puede ser utilizado para rastrear la dispersión de aislamientos.

Además de la mutación en 235, 20 aislamientos presentaron una o varias mutaciones en otros codones que deben estudiarse más profundamente para confirmar si existe asociación verdadera con la resistencia a kanamicina, amikacina o capreomicina.

En el gen *rrs* se encontró alta frecuencia (33%) de los aislamientos con mutaciones en el codón 467, presentando 8 genotipos diferentes, previamente reportado en algunos estudios como fuertemente implicado en resistencia a kanamicina, amikacina o capreomicina pero no en otros estudios. (73). La variabilidad de los reporte podría explicarse por la presencia de diferentes genotipos en los cuales 4 son mutaciones no sinónimas y 3 dan codón de parada, existiendo una mutación sinónima.

Nuestro hallazgo de mutaciones en otros codones diferentes al 467, requiere más estudios para confirmar su relevancia en la detección de aislamientos XDR.

El gran número de aislamientos analizados en el presente estudio permiten asegurar que existe una fuerte asociación entre las mutaciones detectadas en los genes *rpoB* y *katG* con la resistencia a medicamentos de primera línea rifampicina e isoniazida respectivamente mientras que simultáneamente podemos afirmar que las mutaciones en *inhA* y *ahpC* no están fuertemente asociadas con resistencia a isoniazida en los aislamientos colombianos.

Por otra parte, a partir de este estudio podríamos contar con dos blancos moleculares ampliamente útiles en la detección de aislamientos XDR como son *gyrA*, *rrs* y además un blanco posiblemente útil para este efecto como sería *tlyA*.

De lo detectado en el estudio de *gyrA*, *tlyA* y *rrs*, se concluye que la presencia de aislamientos XDR, entre los MDR, no sobrepasa el 12%, lo cual es alentador en el sentido de que la MDR en Colombia se encuentra alrededor del 5% y por lo tanto la XDR no alcanzaría a llegar al 1%.

De los 130 aislamientos MDR, según su distribución por linajes, pudimos evidenciar que el linaje más frecuente en Colombia, el LAM 9, se asocia principalmente con aislamientos sin mutaciones, mientras que el linaje Beijing 190, se asocia con aislamientos portadores de mutaciones claramente implicadas en resistencia a rifampicina e isoniazida y además con mutaciones en los genes *gyrA*, *tlyA* y *rrs* implicadas en resistencia a medicamentos de segunda línea.

8 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con este estudio se pudo describir el perfil de mutaciones presentes en siete genes de los aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis*, del cual no se disponía hasta la fecha, que permitirá confrontarlo con el de otras regiones o países del mundo.

En el gen *rpoB*, los aislamientos colombianos MDR tienen mutaciones fuera del RRDR, que pasarían desapercibidas por los métodos de detección comerciales disponibles hasta la fecha.

En el gen *katG*, solo el 46% de los aislamientos colombianos MDR, portan la mutación S315T que es la más frecuente en el resto de países del mundo, pero el 28% de los aislamientos tienen otras mutaciones que también permitirían detectar los aislamientos MDR.

Las mutaciones en las regiones estudiadas de los genes *inhA* y *ahpC*, no son útiles para la detección de aislamientos MDR.

En los aislamientos colombianos MDR con posibilidad de ser XDR o pre-XDR, existen tres sitios calientes para mutaciones en el gen *gyrA* asociadas con resistencia a fluoroquinolonas que deben estudiarse sistemáticamente para confirmar su relevancia.

La mutación S95T en el gen *gyrA* no puede considerarse como implicada en resistencia a fluoroquinolonas, ya que se encuentra tanto en aislamientos sensibles como MDR.

La mutación A235A descrita por primera vez en este estudio, en el gen *tlyA* de los aislamientos colombianos MDR no puede considerarse como implicada en resistencia a medicamentos de segunda línea (kanamicina, amikacina o capreomicina).

La mutación en el codón 467 del gen *rrs* muy frecuente en los aislamientos colombianos MDR, sirve como marcador de resistencia a kanamicina, amikacina o capreomicina.

Es necesario continuar realizando estudios sistemáticos de los aislamientos colombianos MDR y XDR, en los genes que se encontraron relevantes en el presente estudio.

A partir de este estudio ya se cuenta con los elementos científicos necesarios para el diseño de una metodología apropiada para la detección de los aislamientos colombianos específicamente MDR/XDR.

Con este estudio se pudo identificar las mutaciones propias de los aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* asociadas con fenotipos MDR en los genes *rpoB*, *KatG*, *inhA* y *ahpC*.

En el presente estudio se logró identificar las mutaciones propias de los aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* asociadas con fenotipos XDR en los genes *gyrA*, *rrs* y *tlyA*.

El análisis final del presente estudio permitió identificar las mutaciones que puedan predecir la presencia de fenotipos MDR y XDR en los aislamientos colombianos.

9 BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2013. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2013.
2. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157(3):679-91.
3. World Health Organization (WHO). Anti-tuberculosis drug resistance in the world, fourth global report: the WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2008.
4. Garzón MC, Angée DY, Llerena C, Orjuela DL, Victoria JE. Vigilancia de la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos antituberculosos, Colombia 2004-2005. *Biomédica.* 2008; 28(3):319-26.
5. Aparna M, Liganda L, Aparna S, Jain S, Rao M, Ranganadha R. Clinical and geographical profiles of *rpoB* gen mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Hyderabad and Koraput in India. *J Microbiol and Antimicrob.* 2010; 2:13-18.
6. Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, Bilgic A. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(12):4435-8.
7. Maxim V, Afanas' ev MV, Ikryannikova L, Il'ina EN, Sidorenko SV, Kuz'min AV, *et al.* Molecular characteristics of rifampicin-and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(6):1057-64.
8. Cole S, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998; 393:537-44.
9. Camus J-C, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. *Microbiology.* 2002; 148(10):2967-73.
10. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS medicine.* 2009; 6(2):e1000002. Disponible en <http://www.tbream.com>
11. Wolinsky E, Reginster A, Steenken Jr W. Drug-resistant tubercle bacilli in patients under treatment with streptomycin. *Am Rev of Tuberc.* 1948; 58(3):335-43.

12. Holt, J. G., N. R. Creek, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1994.
13. Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(7):537-44.
14. Falkinham Iii J. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol*. 2009; 107(2):356-67.
15. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*. 2001; 20(1):21-54.
16. Ratledge C, Stanford J. (Ed.). *The biology of the mycobacteria, vol. 1. Physiology, identification and classification*, Academic Press, London. 1982.
17. Lee R, Brennan P, Besra G. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996; 215:1-27.
18. Brennan P. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003; 83(1-3):91-7.
19. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995; 64:29-63.
20. Brennan PJ, Draper P. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis: Pathogenesis, J Tuberc*. 1994; 271-84.
21. Riley M, Labedan B. Protein evolution viewed through *Escherichia coli* protein sequences: introducing the notion of a structural segment of homology, the module. *J Mol Biol*. 1997 May 23; 268(5):857-68.
22. Van Crevel R, Ottenhoff TH, and van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(2):294-309.
23. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Meitzner TA. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. McGraw Hill. Sao Paulo, Brasil. 2005.
24. Yeager Jr H, Lacy J, Smith L, LeMaistre C. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *Am Rev Respir Dis*. 1967; 95(6):998-1004.
25. Katila M-L, Katila P, Erkinjuntti-Pekkanen R. Accelerated detection and identification of mycobacteria with MGIT 960 and COBAS AMPLICOR systems. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(3):960-4.
26. Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R, Alonso R, Fenner T, Schirm J, et al. Multicenter study of a commercial, automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of

- Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in routine clinical practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001; 20(10):724-31.
27. Arias-Bouda LP, Kolk AH. PCR-based assays for the diagnosis of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2001; 5(12):1163-4.
 28. Van Deun A, Martin A, Palomino J. Diagnosis of drug-resistant tuberculosis: reliability and rapidity of detection. Int J of Tuberc and Lung Dis. 2010; 14(2):131-40.
 29. Rodríguez JC, Irazoqui P. Guías para el manejo de la tuberculosis resistente: OMS 2011. Rev Chil Enf Respir. 2012; 28(2):153-8.
 30. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization. 2001; 79(1):71-5.
 31. Caminero Luna JA. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. Paris: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. 2003:312-23.
 32. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(4):658-85.
 33. Van Embden J, Cave MD, Crawford JT, Dale J, Eisenach K, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993;31(2):406-9.
 34. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997; 35(4):907-14.
 35. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol. 2006; 6(1):23.
 36. Warren R, Streicher E, Sampson S, Van Der Spuy G, Richardson M, Nguyen D, et al. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. J Clin Microbiol. 2002; 40(12):4457-65.
 37. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiol Lett. 1994; 123(1-2):11-8.
 38. Kochi A, Vareldzis B, Styblo K. Multidrug-resistant tuberculosis and its control. Res Microbiol. 1993; 144(2):104-10.

39. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94(18):9869-74.
40. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(2):195.
41. Blanchard JS. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65:215-39.
42. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*. 2001; 104(6):901-12.
43. Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N. Mutations in the Beginning of the *rpoB* Gene Can Induce Resistance to Rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(4):1075-7.
44. Yang B, Koga H, Ohno H, Ogawa K, Fukuda M, Hirakata Y, et al. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42(5):621-8.
45. Cavusoglu C, Karaca-Derici Y, Bilgic A. In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10(7):662-5.
46. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci*. 2000; 97(16):8841-8.
47. Scior T, Meneses Morales I, Eisele G, Javier S, Domeyer D, Laufer S. Antitubercular isoniazid and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2002; 335(11-12):511-25.
48. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. 1992.
49. Trujillo M, Mauri P, Benazzi L, Comini M, De Palma A, Flohé L, et al. The mycobacterial thioredoxin peroxidase can act as a one-cysteine peroxiredoxin. *J Biol Chem*. 2006; 281(29):20555-66.
50. Bryk R, Griffin P, Nathan C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*. 2000; 407(6801):211-5.

51. Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(7):1417-30.
52. Rawat R, Whitty A, Tonge PJ. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(24):13881-6.
53. Larsen MH, Vilchèze C, Kremer L, Besra GS, Parsons L, Salfinger M, *et al.* Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 2002; 46(2):453-66.
54. Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(4):1241-50.
55. Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(8):2640-9.
56. Vilchèze C, Jacobs WR Jr. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol.* 2007; 61:35-50.
57. Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradzky KF, Salas-Castillo SP, Ghiladi RA. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis KatG*: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Sci.* 2010; 19(3):458-74.
58. Chen L, Xie Q-w, Nathan C. Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (*ahpC*) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates. *Molecular cell.* 1998; 1(6):795-805.
59. Master S, Springer B, Sander P, Boettger E, Deretic V, Timmins G. Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *ahpC* in resistance to peroxy nitrite and stage-specific survival in macrophages. *J Clin Microbiol.* 2002; 148(10):3139-44.
60. Bryk R, Griffin P, Nathan C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature.* 2000; 407(6801):211-5.
61. Goss WA, Deitz WH, Cook TM. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol.* 1965; 89:1068-74.
62. Aubry A, Pan XS, Fisher LM, Jarlier V, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(4):1281-8.

63. Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem.* 1996; 65:635-92.
64. Madhusudan K, Ramesh V, Nagaraja V. Molecular cloning of *gyrA* and *gyrB* genes of *Mycobacterium tuberculosis*: analysis of nucleotide sequence. *Biochem Mol Biol Int.* 1994; 33(4):651-60.
65. Sun Z, Zhang J, Zhang X, Wang S, Zhang Y, Li C. Comparison of *gyrA* gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31(2):115-2.
66. Tsukamura M, Mizuno S. Cross-resistant relationships among the aminoglycoside antibiotics in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol.* 1975; 88(2):269-74.
67. Johansen SK, Maus CE, Plikaytis BB, Douthwaite S. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Mol Cell.* 2006; 23(2):173-82.
68. Canetti G, Rist N, Grosset J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Rev Tuberc Pneumol (Paris).* 1963; 27:217-72.
69. Yuan X, Zhang T, Kawakami K, Zhu J, Li H, Lei J, *et al.* Molecular characterization of multidrug- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Jiangxi, China. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(7):2404-13.
70. Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs WR Jr, *et al.* Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(4):773-80.
71. J M Musser. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8:496–514.
72. Jugheli L, Bzekalava N, de Rijk P, Fissette K, Portaels F, Rigouts L. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(12):5064-8.
73. Georghiou SB, Magana M, Garfein RS, Catanzaro DG, Catanzaro A, Rodwell TC. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. *PLoS One.* 2012; 7(3):e33275.