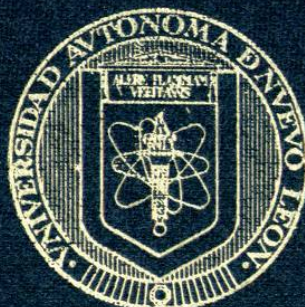


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE
MUTACIONES EN LOS GENES *KatG* Y/O *rpoB* DE
AISLAMIENTOS CLINICOS DE *M. tuberculosis*
RESISTENTES A ISONIACIDA Y/O RIFAMPICINA
DEL NORESTE DE MEXICO

POR

Q.C.B. CLAUDIA MARIBEL LUNA AGUIRRE

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR
E INGENIERIA GENETICA

DICIEMBRE, 1998

TM

QR201

.T6

L8

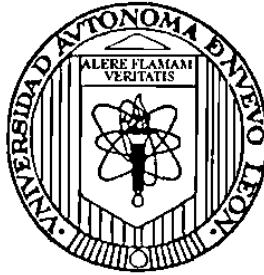
c.1



1080082465

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MUTACIONES EN LOS GENES *katG*
Y/O *rpoB* DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *M. tuberculosis*
RESISTENTES A ISONIACIDA Y/O RIFAMPICINA
DEL NORESTE DE MÉXICO**

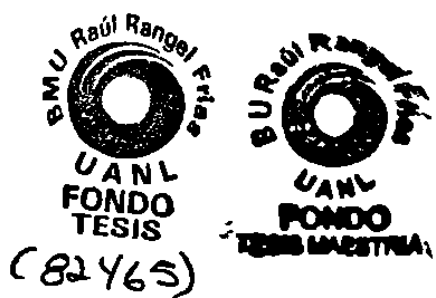
Por

Q.C.B. Claudia Maribel Luna Aguirre

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRIA EN CIENCIAS
con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Diciembre, 1998

TM
QR201
.T6
L8



El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Química Biomolecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. José Ma. Viader Salvadó y la co-asesoría de la Dra. Martha Guerrero Olazarán, el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y el Dr. Rolando Tijerina Menchaca.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Ma. Viader Salvadó, por su paciencia y gran calidad humana.

A la Dra. Martha Guerrero, Dr. Hugo Barrera y Dra. Herminia, por sus valiosas sugerencias en la revisión de la tesis.

Al Dr. Rolando Tijerina, M.C. Elvira Garza y L.C.B. Ma. de la Luz Acevedo, por su asesoría y apoyo en el manejo de los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.

Al Q.C.B. Ramón Valdez y Q.F.B. Ma. de los Angeles del Bosque, del Laboratorio Estatal de Salud, por proporcionar muestras de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.

A mi grupo de generación: Flor, Sandra, Lolita, Eddy, Fermín, Marillo y Vic; además de Claudio, por hacer divertida la maestría.

Al personal administrativo y de intendencia, por el afecto que me brindaron.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada.

DEDICATORIA

A Dios, por dar sentido a mi existencia.

A mis padres: Sanjuana Elvia Aguirre y Salvador Luna López, por su confianza y amor de siempre.

A mis hermanos: Angel (y mi cuñada Alicia), Myrna y Yesi, por su cariño, apoyo y experiencias compartidas.

A Φερμιν, πορ συ ετερνα χομπανια

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 Epidemiología y tratamiento de la tuberculosis..... | 1 |
| 1.2 Resistencia de <i>M. tuberculosis</i> a los antifímicos..... | 2 |
| 1.2.1 Mecanismo de acción y resistencia de <i>M. tuberculosis</i> a Isoniacida (INH)..... | 3 |
| 1.2.2 Mecanismo de acción y resistencia de <i>M. tuberculosis</i> a Rifampicina (RIF)..... | 6 |
| 1.3 Pruebas de susceptibilidad..... | 7 |
| 1.3.1 Métodos tradicionales..... | 7 |
| 1.3.2 Índice de ácidos micólicos..... | 8 |
| 1.3.3 Análisis genético micobacteriano..... | 8 |
| 1.3.3.1 PCR-RFLP..... | 8 |
| 1.3.3.2 Estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB..... | 9 |
| 1.4 Justificación..... | 11 |
| 1.5 Hipótesis..... | 12 |
| 1.6 Objetivo general..... | 12 |
| 1.6.1 Objetivos específicos..... | 12 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 2.1 Origen de las muestras..... | 13 |
| 2.2 Estrategia general..... | 13 |
| 2.3 Establecimiento del banco de DNA genómico de <i>M. tuberculosis</i> resistente a INH y/o RIF..... | 15 |
| 2.3.1 Inactivación de <i>M. tuberculosis</i> | 15 |
| 2.3.2 Extracción de DNA..... | 15 |
| 2.3.3 Cuantificación del DNA..... | 16 |
| 2.4 Detección de mutaciones en los codones 315 y 463 del gen <i>katG</i> en aislamientos clínicos resistentes a INH..... | 17 |
| 2.4.1 Amplificación de un fragmento del gen <i>katG</i> | 17 |
| 2.4.2 Digestión del producto amplificado con las enzimas <i>MspA1 I</i> y <i>Nci I</i> | 19 |

| Capítulo | Página |
|--|-----------|
| 2.5 Detección de mutaciones en el gen <i>rpoB</i> en aislamientos clínicos resistentes a RIF..... | 21 |
| 2.5.1 Amplificación de un fragmento del gen <i>rpoB</i> | 21 |
| 2.5.2 Hibridación del producto amplificado empleando el estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB..... | 23 |
| 2.6 Determinación de la frecuencia de mutaciones de los genes <i>katG</i> y <i>rpoB</i> | 24 |
| | |
| 3. RESULTADOS | |
| 3.1 Establecimiento del banco de DNA genómico..... | 25 |
| 3.2 Detección de mutaciones en los codones 315 y 463 del gen <i>katG</i> en aislamientos clínicos resistentes a INH..... | 27 |
| 3.3 Detección de mutaciones en el gen <i>rpoB</i> en aislamientos clínicos resistentes a RIF..... | 29 |
| 3.4 Determinación de la frecuencia de mutaciones de los genes <i>katG</i> y <i>rpoB</i> | 31 |
| | |
| 4. DISCUSIÓN..... | 36 |
| | |
| 5. CONCLUSIONES..... | 38 |
| | |
| REFERENCIAS..... | 39 |
| | |
| APÉNDICE..... | 44 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|--------|
| I. Reactivos empleados en los ensayos de PCR para un fragmento del gen <i>katG</i> | 18 |
| II. Programa de temperaturas y tiempos de la PCR para un fragmento del gen <i>katG</i> | 18 |
| III. Condiciones de reacción para la digestión con la enzima <i>MspA1</i> I..... | 20 |
| IV. Condiciones de reacción para la digestión con la enzima <i>Nci</i> I..... | 20 |
| V. Reactivos empleados en los ensayos de PCR para un fragmento del gen <i>rpoB</i> | 22 |
| VI. Programa de temperaturas y tiempos de la PCR para un fragmento del gen <i>rpoB</i> | 22 |
| VII. Comparación de la sensibilidad del estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB obtenida en N.L. (México) y la descrita para otras poblaciones..... | 32 |
| VIII. Comparación de la frecuencia de las mutaciones en los codones 315 y 463 que se obtuvieron en N.L. (México) y las descritas para otras poblaciones..... | 32 |
| IX. Comparación de la frecuencia de las mutaciones y patrones INNO-LiPA Rif.TB que se obtuvieron en N.L. (México) con los encontrados en otras poblaciones..... | 33 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. Incidencia de TB en EE.UU..... | 2 |
| 2. Mecanismo de acción de la INH..... | 4 |
| 3. Principio del estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB..... | 9 |
| 4. Interpretación de los patrones de las tirillas..... | 10 |
| 5. Estrategia general..... | 14 |
| 6. Gel de agarosa al 0.8% para evaluar la extracción de DNA de <i>M. tuberculosis</i> | 25 |
| 7. Recta de calibración de DNA de <i>E. coli</i> | 26 |
| 8. Gel de agarosa al 0.8% donde se observa la calidad del DNA aislado de <i>M. tuberculosis</i> | 26 |
| 9. Gel de agarosa al 1.5% para evaluar la amplificación del gen <i>katG</i> | 27 |
| 10. Gel de agarosa al 2.5% para evaluar la digestión analítica de las muestras resistentes a INH..... | 28 |
| 11. Gel de agarosa al 1.5% para evaluar la amplificación del gen <i>rpoB</i> | 29 |
| 12. Tirillas de hibridación del estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB para la detección de mutaciones en el gen <i>rpoB</i> | 30 |
| 13. Comparación de la frecuencia de mutaciones obtenidas en N.L. (México) con las descritas por otras poblaciones..... | 34 |

Figura

Página

14. Comparación de los patrones de las tirillas INNO-LiPA Rif.TB obtenidos en N.L. (México) con los encontrados en otras poblaciones.....35

NOMENCLATURA

| | |
|--------|--|
| Abs | Absorbancia |
| ACP | Proteína Transportadora de Acilos |
| Arg | Arginina |
| Asn | Asparagina |
| ATAM | Area Total de Ácidos Micólicos |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| BSA | Albúmina Sérica Bovina |
| °C | Grados Centígrados |
| CRCEI | Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas |
| DNA | Ácido Desoxiribonucleico |
| dNTP's | Desoxiribonucleósidos trifosfatados |
| DTT | Ditiotritol |
| EDTA | Ácido Etilendiaminotetracético |
| EE.UU. | Estados Unidos |
| FCAI | Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico |
| µg | Gramos |
| g | Veces la fuerza de gravedad |
| HIV | Virus de la Inmunodeficiencia Humana |
| hr (s) | Hora (s) |
| IAM | Índice de Ácidos Micólicos |
| in | pulgadas |
| INH | Isoniacida |
| Leu | Leucina |
| lb | Libras |
| M | Concentración molar |
| mg | Miligramos |
| MIC | Mínima Concentración Inhibitoria |
| min | Minutos |
| ml | Mililitro |
| mM | Concentración milimolar |
| µg | Microgramos |

| | |
|-------|---|
| μl | Micro litro |
| μM | Concentración micromolar |
| NaAcO | Acetato de sodio |
| ng | Nanogramos |
| N.L. | Nuevo León |
| NOM | Norma Oficial Mexicana |
| nuc. | Nucleótidos |
| N.Y. | Nueva York |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| pH | Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno |
| RIF | Rifampicina |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundos |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| Ser | Serina |
| TB | Tuberculosis |
| TBE | Buffer Tris borato-Acido bórico-EDTA |
| TE | Buffer Tris HCl-EDTA |
| Thr | Treonina |
| U | Unidades |
| UANL | Universidad Autónoma de Nuevo León |
| UV | Ultravioleta |
| V | Voltios |
| X | Veces la concentración |

RESUMEN

Claudia Maribel Luna Aguirre
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Diciembre de 1998.

Título del estudio: DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MUTACIONES EN LOS GENES *katG* Y/O *rpoB* DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *M. tuberculosis* RESISTENTES A ISONIACIDA Y/O RIFAMPICINA DEL NORESTE DE MÉXICO

Número de páginas : 46

Candidata al grado de Maestría en Ciencias
con Especialidad en Biología Molecular
e Ingeniería Genética.

Area de estudio: Biología Molecular

Objetivo y Método del estudio: En la última década ha habido un aumento de casos de tuberculosis resistente a muchos fármacos. Se ha estimado en EE.UU. un 28% de resistencia a uno o más antifímicos. En México se ha encontrado una resistencia global a Isoniacida (INH) del 24% y a Rifampicina (RIF) del 19%, antifímicos principales en el tratamiento de la tuberculosis. Se ha visto que la resistencia a INH es debida a mutaciones en el codón 315 principalmente y en el codón 463 del gen *katG* que codifica para una catalasa-peroxidasa que oxida a la INH. La INH oxidada inhibe la enoil-ACP reductasa que participa en la síntesis de ácidos micólicos, originando la muerte del microorganismo. Por otra parte, la resistencia a RIF es conferida por un grupo de mutaciones en una región de 69 pb del gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa, región aminoacídica donde se une la RIF a la RNA polimerasa. Se desconoce si las mutaciones en los genes *katG* y/o *rpoB* involucradas con la resistencia a INH y/o RIF, en México son iguales a las reportadas en otras poblaciones. En caso afirmativo, se podrían utilizar estas mutaciones como marcadores genéticos para la detección rápida de micobacterias resistentes a INH y/o RIF en muestras directas o en cultivos, por lo que en este trabajo se determinó la frecuencia de dicho tipo de mutaciones en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH y/o RIF del Noreste de México. Se procesaron 58 muestras resistentes a INH mediante la metodología descrita por Reyes Ruiz, en donde se amplifica una región del gen *katG*, y el producto amplificado se digiere con las enzimas *MspA1 I* y *Nci I* para la detección de mutaciones en los codones 315 y 463 de este gen; y 58 muestras resistentes a RIF mediante la técnica de hibridación del estuche comercial INNO Li-PA Rif.TB para la detección de mutaciones en el gen *rpoB*.

Contribuciones y conclusiones: Se obtuvo la frecuencia de mutaciones en el codón 315 y 463 del gen *katG* y la frecuencia de mutaciones en el gen *rpoB* de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH y RIF, respectivamente, en muestras de una población de N.L., el 53.4% de las muestras resistentes a INH presentaron mutación en el codón 315 y ninguna en el codón 463 del gen *katG*. Este porcentaje corresponde a la sensibilidad del método, por lo que el porcentaje restante corresponde a aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* que presentan resistencia a INH por mecanismos diferentes a mutaciones en el codón 315 del gen *katG*. En las muestras procesadas resistentes a RIF, se encontró la mutación S531L como la más frecuente (55.2%), al igual que lo reportado en otras poblaciones, a la que le siguió la mutación H526Y (22.4%). La sensibilidad del estuche comercial fue del 98%, esto indica que algunos aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a RIF deben su resistencia a la misma por otros mecanismos. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las frecuencias de mutaciones obtenidas en las muestras resistentes a INH y en la sensibilidad del método, con respecto a las reportadas en otras poblaciones. También se encontraron diferencias significativas de la sensibilidad del estuche comercial y de algunas de las frecuencias de mutaciones obtenidas de las muestras resistentes a RIF con las reportadas en otras poblaciones, por lo que probablemente existan diferentes mecanismos de adquisición de mutaciones en el gen *rpoB* en las distintas áreas geográficas. De lo anterior se concluye que las mutaciones analizadas en los genes *katG* y *rpoB* de *M. tuberculosis* pueden ser utilizadas como marcadores genéticos para detectar rápidamente aislamientos clínicos resistentes a INH y/o RIF del Noreste de México.

FIRMA DEL ASESOR:

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología y tratamiento de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa generalmente crónica, causada por una bacteria ácido-alcohol resistente del género *Mycobacterium* que se transmite por la inhalación de gotitas de flugge o aerosoles.

Murray y colaboradores (1) señalaron que la TB parece ser la causa principal de muerte como consecuencia de infección por un solo agente patógeno en el mundo, y estimaron que ocasiona 7% de todas las defunciones y el 26% de las que se pueden prevenir en el mundo.

Según un informe de la OMS de 1997 (2), 30 millones de personas pueden morir de TB en los próximos 10 años, una tercera parte de la población mundial está infectada con el bacilo de la TB, aproximadamente 8 millones de personas se enfermarán de TB el próximo año, es posible que más de 50 millones de personas puedan ser infectadas con TB resistente a drogas y además la TB es la principal infección mortal de las personas infectadas con el HIV.

Esta enfermedad ha cobrado una gran importancia debido a que la última década ha sido testigo de un incremento en el número de casos. De 1953 (momento en el que se inició el registro nacional de la TB) a 1984, el número de casos reportados en Estados Unidos declinó con un promedio del 5% anual, sin embargo en 1985, esta tendencia se detuvo y en 1986 el número de casos se incrementó en un 2.6% y sigue aumentando en la actualidad (figura 1) (3). Otro reporte indica que entre 1985 y 1992, el número anual de casos de TB se incrementó en un 18% (4). Los casos excesivos de TB son atribuidos en gran medida a la coinfección por el HIV y la resistencia que la micobacteria ha desarrollado a los antifímicos.

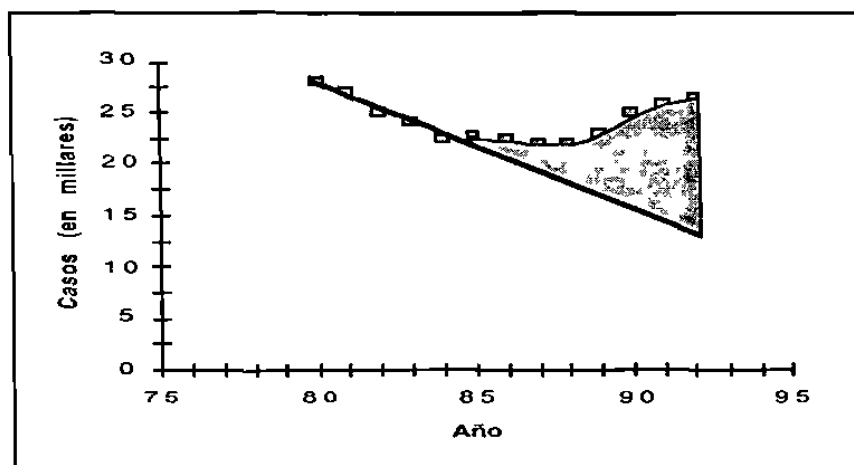


Figura 1. Incidencia de TB en EE.UU. De 1953 a 1984 el número de casos de TB disminuyó un 5% anual, y según las tendencias históricas (como lo indica la línea proyectada hacia abajo) debió seguir disminuyendo, en 1985 esta tendencia se detuvo y a partir de 1986 aumentó un 2.6% anual en promedio. La zona sombreada representa los casos excesivos de TB.

El tratamiento que se aplica actualmente en México contra la TB, según la Norma Oficial Mexicana-006-SSA2-1993, tiene una duración de 6 meses, combinándose 3 drogas (Isoniacida, Rifampicina y Piracinamida) por 4 meses, y 2 drogas (Isoniacida y Rifampicina) por los 2 meses restantes (5).

1.2 Resistencia de *M. tuberculosis* a los antifímicos

La resistencia de *M. tuberculosis* a antifímicos ha sido una de las causas más importantes del incremento de la TB. Algunos estudios han estimado que el 28% de los aislamientos clínicos de pacientes tuberculosos son resistentes a uno o más de los antifímicos que forman parte de la línea frontal de defensa contra esta enfermedad (6). Un estudio realizado en América Latina encontró un índice de resistencia a una o más drogas del 16.8%. El rango de resistencia en estos países fue amplio, ya que varió entre 7 y 42%, siendo para México del 19.1% (7). En México se reportó una resistencia global a Isoniacida (INH) del 24% y a Rifampicina (RIF) del 19%, presentándose una resistencia primaria del 9% a INH y 6% a RIF y una resistencia secundaria del 44% a INH y 35% a RIF (8).

La resistencia primaria es la que se presenta desde el inicio del tratamiento en pacientes no tratados con anterioridad, lo que indica la presencia de microorganismos predominantemente resistentes al fármaco; la resistencia secundaria es la que se presenta en los pacientes durante el curso del tratamiento debido al deficiente cumplimiento del régimen prescrito (ej. interrupción del tratamiento), vigilancia insuficiente o selección de un régimen farmacológico inapropiado (ej. la administración de una sola droga) (9).

1.2.1 Mecanismo de acción y resistencia de *M. tuberculosis* a INH

La INH (hidrazida del ácido isonicotínico) es un agente antimicrobiano sintético introducido en 1952 para el tratamiento de la tuberculosis, que tiene acción bactericida marcadamente específica y potente contra el bacilo tuberculoso (10), e inactiva con rapidez a los microorganismos tanto extracelulares como intracelulares. Se considera piedra angular del tratamiento de la tuberculosis y se debe incluir en todos los regímenes, excepto en los casos en que la resistencia a la INH es elevada y además el régimen farmacológico incluye RIF. Se absorbe bien y experimenta metabolismo hepático tanto por acetilación como por oxidación por el sistema del citocromo p-450 (9).

La resistencia de la micobacteria a la INH se empezó a investigar a partir de 1954, cuando Middlebrook (11) observó que las cepas de *M. tuberculosis* altamente resistentes a INH carecían o tenían una importante disminución en la actividad de la catalasa (12, 13). Este descubrimiento y evidencia bioquímica implicando a la catalasa-peroxidasa en la actividad antituberculosa de la INH (14), llevó a una serie de investigaciones sobre el gen *katG* que codifica para esta enzima. Zhang *et al.* reportaron el restablecimiento de la susceptibilidad a INH de cepas de *M. smegmatis* resistentes al introducirles el gen *katG* (15). Otros investigadores clonaron y caracterizaron este gen (16).

En base a estos conocimientos, actualmente se propone como mecanismo de acción de la INH (figura 2) a su activación por una catalasa-peroxidasa micobacteriana (codificada por el gen *katG*), que al entrar en contacto con la INH la oxida. Después, la INH oxidada inhibe la actividad de la enoil-ACP reductasa (codificada por el gen *inhA*) que participa en la síntesis de ácidos micólicos α -alquil- β -hidroxiácidos de 70 a 90 átomos de carbono componentes de la pared celular de la micobacteria (17). Así, un descenso en la actividad de esta enzima genera la muerte del microorganismo al quedar incompleta su pared celular. Adicionalmente, la enzima alquilhidroperóxido reductasa participa en la destoxificación del intermediario activo de la INH. El gen que codifica para esta enzima (*ahpC*) está controlado por el gen *oxyR*, quien a su vez está regulado por un

estrés oxidativo. Este último gen no es funcional en *M. tuberculosis* y *M. bovis*, mientras que permanece activo en otras micobacterias, justificando así la susceptibilidad mayor de *M. tuberculosis* y *M. bovis* a la INH.

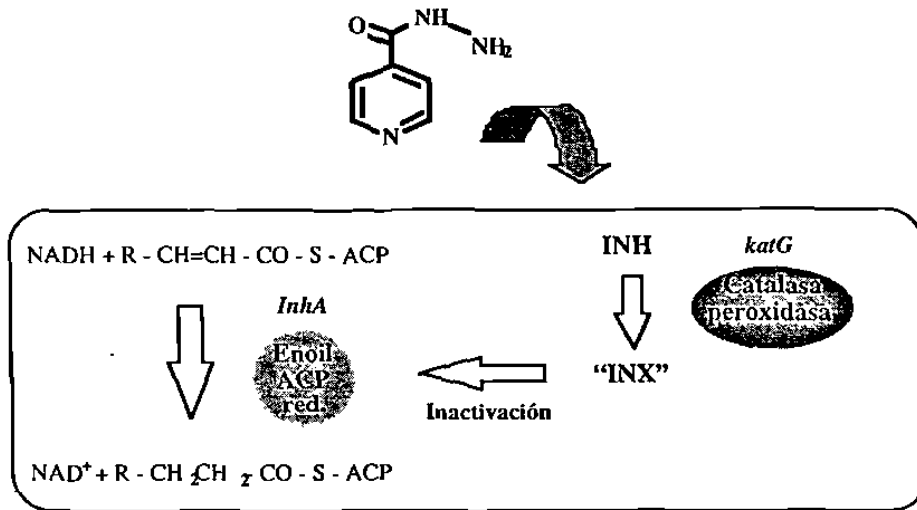


Figura 2. Mecanismo de acción de la INH. La INH entra a la micobacteria, es activada por una catalasa-peroxidasa, la INH activada inhibe la actividad de la enoil-ACP reductasa que participa en la síntesis de ácidos micólicos componentes de la pared celular de la micobacteria, lo que origina la muerte del microorganismo.

En una revisión reciente (18), se ha descrito una frecuencia de mutaciones asociada con la resistencia a INH del 47-50% en el gen *katG*, 21-24% en el gen *inhA*, 10-15% en el gen *ahpC* y menor de un 10% por mecanismos desconocidos actualmente, quedando claro la mayor participación de mutaciones en el gen *katG* en la adquisición de la resistencia a INH de *M. tuberculosis*.

La catalasa-peroxidasa de *M. tuberculosis* es una proteína de 80 kDa, con una similitud a la hidropoxidasa I de *E. coli* (19) y otras catalasa-peroxidasa microbianas. La observación de que 2 de 3 aislamientos de pacientes resistentes a INH carecían de secuencias del gen *katG* (15) sugirió que la delección del gen sería un mecanismo común de resistencia, pero pronto se demostró que la mayoría de las cepas resistentes a INH tenían el gen *katG* sin delecciones (20) aunque presentaban mutaciones puntuales, sin sentido o terminales, o bien pequeñas delecciones. El descubrimiento de que la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH no tenían delecciones importantes en el gen

katG, sugirió la necesidad de un análisis más preciso de este gen en microorganismos susceptibles y resistentes, y esto ha sido realizado por muchos grupos (21, 22). Algunos investigadores han reportado una variación alélica substancial del gen *katG* en cepas tanto susceptibles como resistentes a INH, y un gran número de mutaciones sin sentido y de otro tipo han sido asociadas con la resistencia a INH (21). Otros, en un contraste notable, secuenciaron el gen *katG* de un total de 7 cepas susceptibles y resistentes y no encontraron mutaciones en este gen (23). Además, otros investigadores han reportado un grupo restringido de mutaciones sin sentido en cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH (14). Por lo tanto, dos puntos de vista divergentes han emergido con respecto al nivel de variaciones alélicas del gen *katG* en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* susceptibles y resistentes y a las características de las variaciones del gen *katG* asociadas a resistencia a INH. Como consecuencia, hay una clara necesidad de generar datos de genética molecular referentes a las mutaciones de este gen en cepas resistentes a INH. Recientemente se ha encontrado que las mutaciones en el gen *katG* más frecuentes (juntas, explican el 71% de los casos) asociadas a resistencia a INH se encuentran en el codón 315 donde hay un cambio Ser→Thr (AGC→ACC ó AGC→ACA) ó Ser→Asn (AGC→AAC) (12), con pérdida de un sitio de restricción para la enzima *MspA1* I, y en el codón 463, donde el cambio es de Arg→Leu (CGG→CTG) (12,13), perdiéndose un sitio de restricción para las enzimas *Nci* I ó *Bcn* I. La mutación en el codón 315 y 463 tienen una frecuencia del 53 y 39%, respectivamente, según un estudio realizado en 34 muestras provenientes de diversos países. Otras mutaciones se presentaron en un 24% (12). Sin embargo, una publicación reciente de Corea mostró que la mutación en el codón 463 no está relacionada con la resistencia a INH (24).

1.2.2 Mecanismo de acción y resistencia de *M. tuberculosis* a RIF

La RIF es el segundo agente antituberculoso en orden de importancia, y el segundo frente al cual la micobacteria presenta con más frecuencia resistencia, es un derivado semisintético de la rifamicina, la cual se obtiene de cultivos de *Streptomyces mediterranei* (17), fue introducida en 1968 como un potente agente antituberculoso, es activa contra una amplia variedad de bacterias no-ácido alcohol resistentes y otras micobacterias de crecimiento lento (10). Es más eficaz que la INH para actuar en ambientes relativamente protegidos (focos caseosos sólidos e interior de la células fagocíticas) (9). Es extremadamente efectiva contra *M. tuberculosis* (MIC 0.1-0.2 g/ml) y de actividad bactericida rápida, actúa inhibiendo específicamente la elongación de transcritos de la micobacteria (17), al unirse al presunto centro catalítico de la RNA polimerasa, lo que origina la muerte del microorganismo.

La resistencia de *M. tuberculosis* a RIF es conferida por un grupo de mutaciones dentro de una región hipervariable ("hot spot") de 69 pb del gen *rpoB*, el cual codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa de la micobacteria (25). Aproximadamente el 95% de los aislamientos clínicos resistentes a RIF de los EE.UU. (26) y otros países (27) poseen mutaciones dentro de la región hipervariable de 69 pb del gen *rpoB*. Se han descrito más de 35 mutaciones dentro de esta región (28) correlacionadas con la resistencia a RIF, siendo la mayoría de ellas simples cambios nucleotídicos (17) que originan sustituciones aminoacídicas (93%) y las mutaciones restantes son inserciones (3%) y deleciones (4%). Se cree que todas las mutaciones se encuentran entre los aminoácidos 511 al 533, región de la RNA polimerasa correspondiente al sitio de unión con la RIF. Aproximadamente el 60% de todas las mutaciones (17) son una sustitución de la Histidina 526 por Tirosina, originada por el cambio nucleotídico de CAC->TAC, o de la Serina 531 por Leucina, originada por el cambio nucleotídico de TCG->TTG. Recientemente en un estudio realizado en la ciudad de Nueva York (29) se analizaron 51 aislamientos clínicos resistentes a RIF y encontraron frecuencias de estas mutaciones del 39% y 33%, respectivamente. Estas mutaciones puntuales no están involucradas en la aparición o desaparición de un sitio de restricción, por lo que para detectarlas es necesario emplear técnicas acopladas a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como polimorfismo conformacional de cadena sencilla, heteroduplex, o hibridación con sondas específicas. Actualmente existe un estuche comercial que emplea esta última tecnología (29).

1.3 Pruebas de susceptibilidad

1.3.1 Métodos tradicionales

Los métodos aceptados para determinar la susceptibilidad de micobacterias están basados en el crecimiento de los microorganismos en medios sólidos o líquidos conteniendo una determinada concentración de una droga única (10). Entre estos se encuentran el método indirecto de proporción, el método radiométrico o método BACTEC y el método del informador de luciferasa.

El método indirecto de proporción requiere de un tiempo de incubación de 3 semanas del aislamiento clínico en medio Middlebrook 7H10 (preferentemente) en presencia y ausencia de la droga a evaluar, se determinan los resultados como porcentaje de colonias en crecimiento en el medio que contiene el fármaco, en comparación con las que crecen en medio libre de éste (30).

El método BACTEC utiliza viales con caldo 12B el cual contiene ácido palmítico marcado con ^{14}C como única fuente de carbono, la micobacteria metaboliza este sustrato liberando al medio $^{14}\text{CO}_2$, la velocidad y cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ producido es directamente proporcional a la velocidad y cantidad de crecimiento de la micobacteria (10). Este método requiere de un tiempo promedio de 5 días a partir del aislamiento clínico, no permite estimar el porcentaje de bacilos resistentes, puede generar susceptibilidad falsa o resistencia causada por poblaciones mixtas de especies micobacterianas, requiere de un aparato de la compañía Becton Dickenson, emplea isótopos radioactivos y medios selectivos que lo hacen un método costoso.

El método del informador de luciferasa (31) está basado en la producción de luz por micobacterias infectadas con un fago reportero específico el cual contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga. Esta enzima cataliza la reacción de luciferina con el trifosfato de adenosina (ATP) para generar fotones. De esta manera se prueba rápidamente la viabilidad celular de *M. tuberculosis* después de exponerla a los agentes antimicobacterianos. Los resultados se obtienen en un tiempo promedio de 5 días, empleando un sistema de detección sencillo.

1.3.2 Índice de ácidos micólicos

Recientemente, investigadores de la UANL (32), han descrito una relación exponencial entre el área total de los picos cromatográficos identificados como ácidos micólicos (ATAM) de un cultivo de *M. tuberculosis*, y las unidades formadoras de colonias por ml, obtenidas mediante el método tradicional de cuenta en placa, después de incubar tres semanas en medio Middlebrook 7H10. Este resultado muestra la posibilidad de utilizar el ATAM como parámetro estimador del desarrollo micobacteriano y utilizar un Índice de Ácidos Micólicos (IAM) en pruebas de susceptibilidad, mostrando una disminución importante en el tiempo de obtención de resultados, respecto al tiempo requerido por el método indirecto de proporción. Resultados preliminares indican una muy buena correlación de este método con el método indirecto de proporción (33).

1.3.3 Análisis genético micobacteriano

Como ya se ha mencionado anteriormente, la resistencia a antifímicos de *M. tuberculosis* es debida a la alteración de las moléculas que son el blanco de acción de estos fármacos y no por la introducción de genes que confieran resistencia. A nivel genético la resistencia se adquiere mediante mutaciones espontáneas de los genes que codifican para las proteínas blanco de los antifímicos. Por tanto, para el desarrollo de pruebas de susceptibilidad en base a un análisis genético se requiere de la identificación de estos genes y la determinación de las mutaciones específicas que dan por resultado el fenotipo de resistencia.

1.3.3.1 PCR-RFLP

Esta prueba detecta la presencia de mutaciones en el codón 315 y 463 del gen *katG* relacionadas con la resistencia a INH (34). Se incluyó una cepa susceptible a INH como control negativo. Mediante la amplificación de un fragmento de DNA de 786 pb del gen *katG*, utilizando oligonucleótidos diseñados en ese trabajo, el producto amplificado se digirió con las enzimas *MspA1 I* y *Nci I* por separado, los cortes se analizaron en un gel de agarosa y posteriormente se analizó el patrón de bandas, previa tinción del gel con bromuro de etidio. Las muestras sin mutación en el codón 315, presentaron 2 bandas, una de 343 y otra de 306 pb; las muestras con mutación en este codón, presentaron también 2 bandas, una de 409 y otra de 306 pb. Las muestras sin mutación en el codón 463, presentaron 3 bandas, de 294, 253 y 204 pb; las muestras que

presentaran mutación en este codón, se esperaba observar 2 bandas, de 498 y 253 pb, pero no se obtuvo ninguna muestra con este patrón. Se procesaron 10 muestras resistentes a INH, de las cuales 6 presentaron mutación en el codón 315 y ninguna presentó mutación en el codón 463. Estos datos coinciden con los reportados a pesar de las pocas muestras que se analizaron.

1.3.3.2 Estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB

Otra de las pruebas de susceptibilidad por análisis genético, es un estuche comercial que detecta mutaciones en el gen *rpoB* relacionadas con la resistencia a RIF, esta prueba está basada en el principio de hibridación reversa. El producto amplificado biotinilado es hibridado con sondas oligonucleotídicas específicas inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa. Después de la hibridación se añade estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina, la cual se une a cualquier híbrido biotinilado previamente formado; la incubación con el cromógeno produce un precipitado rojizo (figura 3). Un simple cambio nucleotídico en el producto amplificado es limitante de la formación del híbrido gracias a lo cual se pueden detectar las mutaciones puntuales más frecuentes.

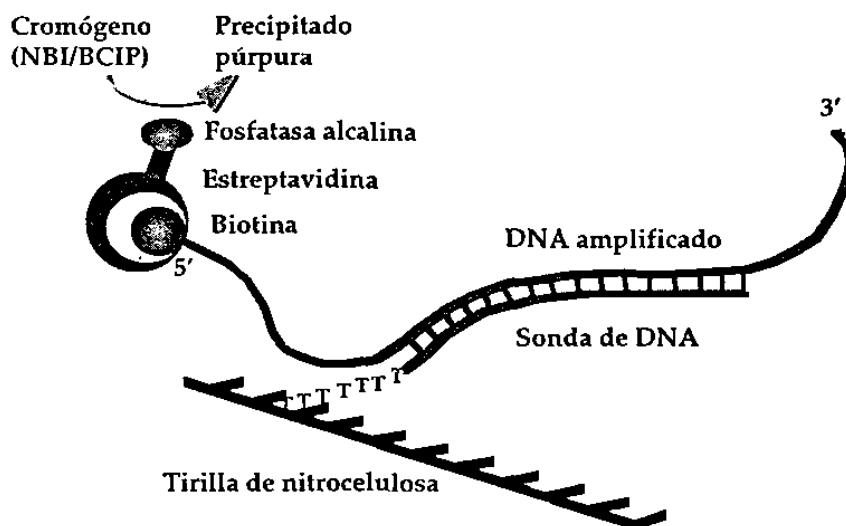


Figura 3. Principio del estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB. El producto amplificado biotinilado se hibrida a las sondas oligonucleotídicas inmovilizadas en una membrana, posteriormente se añade estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina que se une al híbrido formado, la adición del cromógeno origina una coloración púrpura en la membrana.

El producto amplificado biotinilado es de 257 pb, e incluye la región de 69 pb que presenta la mayoría de las mutaciones que confieren resistencia a RIF. El estuche consta de 5 sondas tipo silvestre que abarcan toda la región y de 4 sondas que se hibridan específicamente a secuencias mutadas, siendo las 4 más frecuentemente observadas: D516V, H526Y, H526D y S531L (figura 4).

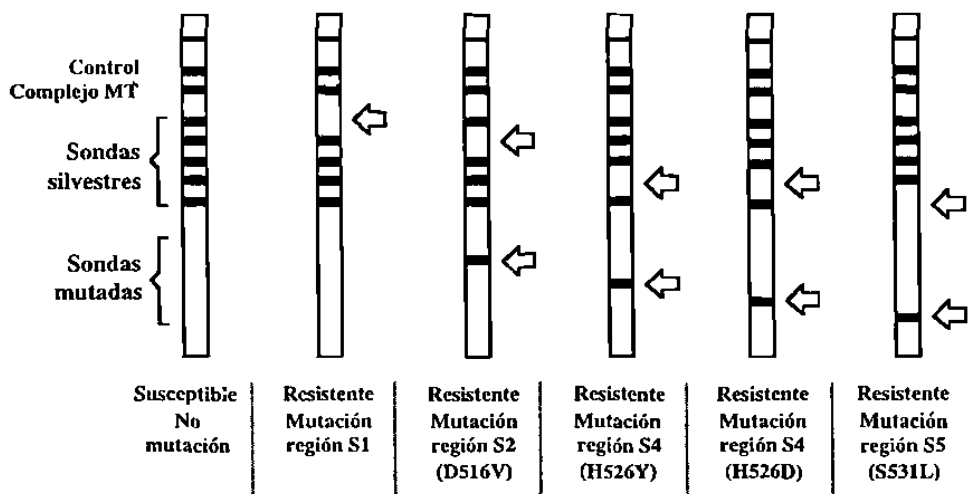


Figura 4. Interpretación de los patrones de las tirillas. La presencia de las 5 sondas S corresponde a un patrón tipo silvestre; la ausencia de una sonda S indica la presencia de una mutación en la región de DNA que abarca la sonda S correspondiente; si además de la ausencia de una sonda S (S2, S4 o S5), se presenta una sonda R (R2, R4a, R4b o R5), indica la presencia de una mutación específica.

1.4 Justificación

En México se carece de estadísticas confiables de los patrones de resistencia de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, debido a que no se realizan pruebas de susceptibilidad de forma rutinaria a todas las muestras aisladas. Además, los laboratorios que realizan estas pruebas requieren de un mínimo de 3 semanas para el aislamiento clínico y dependiendo del método a seguir, de 5 días a 3 semanas más. Si se utiliza el método indirecto de proporción (35), el cual requiere de un mínimo de tres semanas después del aislamiento clínico, los resultados de susceptibilidad se obtienen después de 6 semanas a partir de la llegada de la muestra; si se utiliza el método BACTEC o el Índice de Ácidos Micólicos, los resultados estarán 3 semanas 5 días después de la llegada de la muestra, retrasándose así una información muy valiosa para diseñar una terapia específica e individualizada.

Por otro lado, en México se desconoce totalmente si están involucradas y en qué frecuencia las mismas mutaciones en los genes *katG* y *rpoB* con la resistencia a INH y RIF, respectivamente.

1.5 HIPÓTESIS

Si las mutaciones en los genes *katG* y/o *rpoB* involucradas con la resistencia a INH y/o RIF, en el Noreste de México, son las reportadas en otros países, se podrían utilizar estas mutaciones como marcadores genéticos para la detección rápida de micobacterias resistentes a INH y/o RIF en muestras directas.

1.6 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de mutaciones en los genes *katG* y/o *rpoB* de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a INH y/o RIF del Noreste de México.

1.6.1 Objetivos específicos

1. Establecer un banco de DNA genómico de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a INH y/o RIF.
2. Detectar mutaciones en los codones 315 y 463 del gen *katG* en aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a INH.
3. Detectar mutaciones en el gen *rpoB* en aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a RIF.
4. Determinar la frecuencia de las mutaciones de los genes *katG* y *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a INH y RIF respectivamente, en el Noreste de México, y hacer una comparación con las reportadas en otras poblaciones.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Origen de las muestras

Se emplearon 67 aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* (49 resistentes a INH y RIF, 9 resistentes a INH y 9 resistentes a RIF) que fueron proporcionados por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de los Servicios de Salud de N.L. (58 aislamientos) y por el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL (9 aislamientos). En todas las muestras se determinó previamente la identificación de la micobacteria mediante el patrón cromatográfico de ácidos micólicos (36) o la prueba de la niacina, así como la resistencia a los antifímicos mediante el método indirecto de proporción o el método del índice de ácidos micólicos (33).

2.2 Estrategia general

Para cumplir con el objetivo planteado se siguió la siguiente estrategia general (figura 5): Se procesaron 58 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH y 58 resistentes a RIF. Se inactivó la micobacteria a 80°C durante una hora en un baño de agua, se extrajo el DNA y se cuantificó. Posteriormente se realizó la PCR de un fragmento del gen *katG* del DNA proveniente de los aislamientos clínicos resistentes a INH, empleando los oligonucleótidos diseñados en el trabajo de Reyes Ruiz (32), y de un fragmento del gen *rpoB* del DNA proveniente de los aislamientos clínicos resistentes a RIF, empleando los oligonucleótidos del estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB.

El producto amplificado proveniente del DNA de los aislamientos clínicos resistentes a INH se digirió por separado con las enzimas *Msp* A1 I y *Nci* I y se analizó el patrón de bandas en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Por otra parte, al producto amplificado proveniente del DNA de los aislamientos clínicos resistentes a RIF se le realizó la técnica de hibridación empleando el estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB.

Por último se determinó la frecuencia de mutaciones en los genes *katG* y *rpoB*, y se compararon con las reportadas en otras poblaciones.

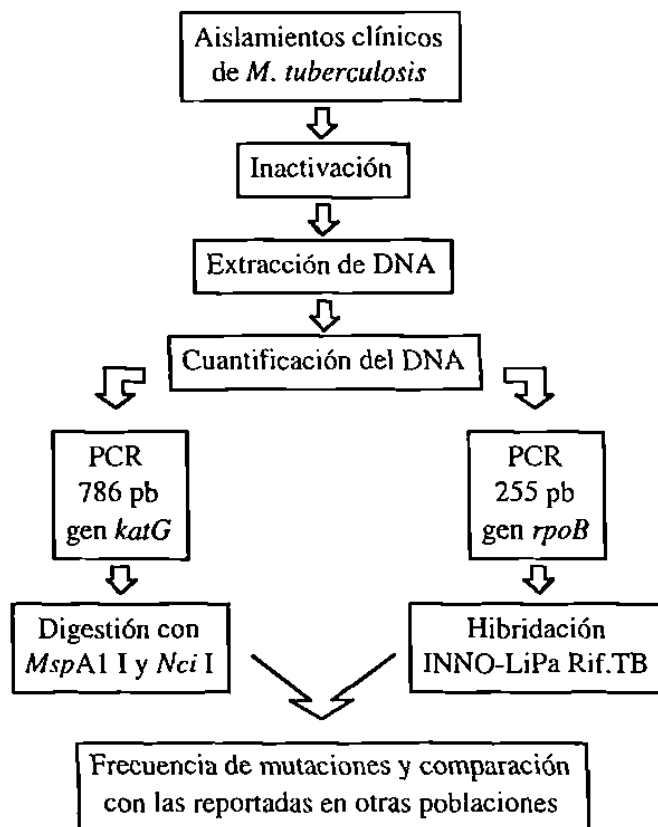


Figura 5. Estrategia general. Los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* se inactivaron, se extrajo el DNA y se cuantificó, se realizó la PCR, posteriormente la digestión con enzimas de restricción, e hibridación del producto amplificado proveniente de las muestras resistentes a INH y RIF, respectivamente, finalmente se determinó la frecuencia de mutaciones y se comparó con las reportadas en otras poblaciones.

2.3 Establecimiento del banco de DNA genómico de *M. tuberculosis* resistente a INH y/o RIF

2.3.1 Inactivación de *M. tuberculosis*

Se llevó a cabo en una campana de flujo laminar tipo II (Labconco) equipada con filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) a una presión de 0.35 pulgadas de agua. Se trabajó utilizando bata, guantes y cubrebocas. La campana y las superficies externas del material empleado se desinfectaron con formaldehído al 5% y etanol al 70%. A las muestras de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH y/o RIF procedentes del CRCEI se les añadieron 3 ml de buffer TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) estéril, se disgregaron las colonias con un aplicador y se colocó con una pipeta Pasteur la suspensión micobacteriana en tubos Falcon de 15 ml. Las muestras de *M. tuberculosis* provenientes del Laboratorio Estatal de Salud venían conservadas en un medio con leche, por lo que se tomó aproximadamente 0.5 ml de la suspensión micobacteriana y se dispersó en tubos falcon de 15 ml conteniendo previamente 1.5 ml de buffer TE 1X pH 8.0. En cualquiera de los dos casos, los tubos se sumergieron por completo en un baño de agua a 80°C durante una hora, posteriormente se procesaron inmediatamente o se almacenaron a -20°C. La eficiencia de la inactivación se probó sembrando con una pipeta Pasteur 2 gotas de la suspensión micobacteriana sometida una hora a 80°C, en un tubo con medio de Lowenstein-Jensen inclinado, se incubó 3 semanas a 37°C, los cultivos se descartaron como negativos a los 3 meses.

2.3.2 Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo con el método modificado de Kulski *et al.*, (37) que se describe a continuación. Se colocó 1.5 ml de la suspensión micobacteriana inactivada en tubos eppendorf de 2 ml, se centrifugó a 8,000 X g (10,000 rpm) en una microcentrífuga 5415 C (Eppendorf) por 5 min. La pastilla se resuspendió en 1 ml de solución Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, Tween 20 1%, pH 8.0 y Lisozima a 2 mg/ml (se preparó justo antes de usar). La mezcla se incubó 2 hrs a 37°C en agitación constante (Mixer 5432, Eppendorf) y se centrifugó a 8,000 X g (10,000 rpm) en la microcentrífuga por 5 min. La pastilla se resuspendió en 0.5 ml de buffer TE 1X pH 8.0, conteniendo 100 µg/ml de RNasa A libre de DNasa y se incubó 1 hr a 37°C. Se

centrifugó a 8,000 X g (10,000 rpm) por 5 min y se resuspendió en 0.5 ml de TE 1X pH 8.0, conteniendo 100 µg/ml de Proteinasa K y SDS al 1%, incubándose por 20 min a 60°C. Se extrajo con igual volumen de FCAI (Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico 25:24:1), se agitó y se centrifugó a 8,000 X g (10,000 rpm) por 5 min. La fase acuosa se removió, se pasó a otro tubo con 0.1 volúmenes de NaAcO frío 3 M pH 5.2, se mezcló, se puso en hielo por 10 min y después se centrifugó por 10 min a 8,000 X g (10,000 rpm). El sobrenadante se pasó a otro tubo y se precipitaron los ácidos nucleicos con 0.05 volúmenes de NaAcO frío 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol. Los ácidos nucleicos se centrifugaron por 5 min a 8,000 X g (10,000 rpm). El sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó con etanol al 70%, se secó al vacío (Centrivap concentrator, Labconco) y se resuspendió en 50-100 µl de TE.

2.3.3 Cuantificación de DNA

Una vez obtenido el DNA, se hicieron diluciones 1:10 con TE 1X pH 8.0 a partir de la solución stock y se procedió a cuantificarlo por densitometría en geles de agarosa, utilizando un DNA procedente de *E. coli* con un alto grado de pureza determinada por espectrofotometría (relación $Abs_{260}/Abs_{280}=2.0$) como estándar. Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en TBE 1X (Tris-borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M y EDTA 2 mM pH 8.0) de 100 ng, 200 ng, y 300 ng del DNA de *E. coli* junto con 2 µl de los DNA de *M. tuberculosis* a los cuales previamente se les añadió 3 µl de buffer TE 1X pH 8.0 y 1 µl de jugo azul 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%). Se utilizó la cámara de electroforesis *Mini Single Cell (E)1-1408* (FOTODYNE) y se electroeluyó en buffer TBE 1X pH 8.0 a 75 V por 60 min ó a 90 V por 45 min. Posteriormente los geles se tiñeron con bromuro de etidio a 2 µg/ml por 10 min y se lavaron con agua para quitarles el exceso del bromuro de etidio. Los geles se analizaron en el equipo *Gel Doc 1000* (Bio Rad), en donde las bandas del gel fueron visualizadas por medio de una lámpara de luz UV y la imagen del gel fue capturada por una cámara de video y transferida a una computadora. Con las herramientas del programa *Molecular Analyst 1.5* se encerró cada banda y por contraste de negro y blanco se registró su intensidad. Utilizando el DNA de *E. coli* se hizo una recta de calibración y por interpolación con la intensidad de las bandas del DNA de *M. tuberculosis*, el programa calculó la cantidad en ng de DNA de las muestras, cuya concentración en ng/µl se determinó dividiendo los ng de DNA entre los µl de DNA diluido depositados en el gel, y posteriormente multiplicando el cociente por la dilución realizada al DNA.

2.4 Detección de mutaciones en los codones 315 y 463 del gen *katG* en aislamientos clínicos resistentes a INH

2.4.1 Amplificación de un fragmento del gen *katG*

Se amplificó un fragmento de 786 pb del gen *katG* del DNA genómico de *M. tuberculosis* proveniente de los aislamientos clínicos resistentes a INH, empleando los oligonucleótidos diseñados en el trabajo de Reyes Ruiz (34).

La reacción de la PCR se llevó a cabo con los volúmenes descritos en la tabla I. Simultáneamente con el ensayo problema, se incluyeron un testigo positivo de amplificación (DNA de *M. tuberculosis* H37Ra) y un testigo negativo (en lugar de DNA se utilizó agua estéril). Los tubos de reacción se prepararon a partir de un coctel de reacción en el cual se agregaron previamente todos los reactivos (siguiendo el orden de la tabla I) excepto el DNA. Después de agregar el DNA a cada tubo, se añadió una gota de aceite mineral (Sigma, grado Biología Molecular) para evitar la evaporación durante la reacción, los tubos se centrifugaron por 10-15 s a 16,000 X g (14,000 rpm) en una microcentrífuga 5415 C (Eppendorf) y se colocaron en el termociclador PTC 150 (MJ Research, Watertton USA), al cual previamente se le introdujo el programa de temperaturas y tiempos que se describe en la tabla II (para la PCR).

Terminada la PCR se verificó la amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en TBE 1X pH 8.0 de los productos amplificados (2 µl de producto amplificado + 3 µl de TE 1X pH 8.0 + 1 µl de jugo azul 6X). Se incluyó el marcador de peso molecular pBR 322 + *Alu* I para determinar el tamaño de las bandas obtenidas. Se electroeluyó en TBE 1X pH 8.0 a 75 V por 1 hr en una cámara de electroforesis *Mini Single Cell* (FOTODYNE), y los geles se tiñeron con bromuro de etidio (2 µg/ml) por 10 min. Posteriormente se analizaron en el equipo Gel Doc 1000 (Bio Rad).

Tabla I

**Reactivos empleados en los ensayos de PCR
de un fragmento del gen *katG***

| Reactivo | Concentración stock | Volumen/ Reacción ^a | Concentración final |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Buffer ^b | 10 X | 2.5 µl | 1 X |
| MgCl ₂ | 25 mM | 1.5 µl | 1.5 mM |
| Oligonucleótido-katG I | 5 µM | 2.5 µl | 0.5 µM |
| Oligonucleótido katG D | 5 µM | 2.5 µl | 0.5 µM |
| dNTP's | 10 mM | 0.5 µl | 200 µM |
| H ₂ O Milli-Q estéril | - | 14.25 µl | - |
| Taq DNA Polimerasa ^c | 5 U/µl | 0.25 µl | 0.05 U/µl |
| DNA | 150 ng/µl | 1.0 µl | 6 ng/µl |

^a Volumen final de reacción 25 µl

^b Buffer 10X: KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9.0 y Tritón X-100 al 1.0% (Promega)

^c Buffer de Almacenamiento A: Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 5 mM, glicerol 50% y Tritón X-100 1.0% (Promega)

Tabla II

**Programa de temperaturas y tiempos utilizado en los ensayos de PCR
para el gen *katG***

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Observaciones |
|------|------------------|--------------|----------------------------|
| 1 | 94 | 5 | Desnaturalización inicial |
| 2 | 94 | 1 | Desnaturalización |
| 3 | 61 | 1 | Apareamiento |
| 4 | 72 | 1 | Extensión |
| 5 | - | - | Repetir pasos 2-4 30 veces |
| 6 | 72 | 5 | Extensión prolongada |

2.4.2 Digestión del producto amplificado del gen *katG* con las enzimas *MspA1 I* y *Nci I*

Una vez obtenida la amplificación, se realizaron las digestiones de los productos amplificados con las enzimas: *MspA1 I* (New England BioLabs) para determinar la presencia de mutación en el codón 315 y con *Nci I* (GIBCO BRL) para la mutación en el codón 463 del gen *katG*, relacionadas con la resistencia a INH.

Para ambas digestiones, la mezcla de reacción de cada tubo se preparó a partir de un coctel de reacción al que se le agregaron todos los reactivos (en el orden indicado en las tablas correspondientes), excepto el producto amplificado, el cual se agregó al final al tubo correspondiente. Simultáneamente se digirió el producto amplificado proveniente de DNA de *M. tuberculosis* H37Ra como control negativo de mutación en los codones 315 y 463, y un control negativo de corte que no contenía la enzima pero si producto amplificado.

Las condiciones de reacción para las digestiones con las enzimas *MspA1 I* y *Nci I* se describen en la tabla III y IV, respectivamente. En ambos casos los tubos conteniendo las reacciones de digestión se incubaron a 37°C por 24 hrs, aunque en algunas muestras se verificó que eran suficientes 4 hrs de incubación.

Concluida la reacción, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2.5% en TBE 1X pH 8.0 de los productos de digestión (5 µl de producto amplificado + 1 µl de jugo azul 6X), incluyéndose un marcador de peso molecular alto (pBR 322 + *Alu I*) y un marcador de peso molecular bajo (pBR 322 + *Msp I*) para determinar el tamaño de las bandas obtenidas. Se electroeluyó en TBE 1X pH 8.0 a 75 V por 1 hr 30 min en una cámara de electroforesis *Mini Single Cell* (FOTODYNE) y los geles se tiñeron con bromuro de etidio (2 µg/ml) por 10 min. Posteriormente se analizaron en el equipo Gel Doc 1000 (Bio Rad).

Tabla III**Condiciones de reacción para la digestión con la enzima *MspA1 I***

| Reactivo | Volumen/Reacción ^a |
|------------------------|-------------------------------|
| Agua Milli-Q estéril | 9.9 μ l |
| Buffer ^b | 1.5 μ l |
| BSA ^c | 1.5 μ l |
| Enzima (10 U/ μ l) | 0.1 μ l (1 U) |
| Producto amplificado | 2.0 μ l |

^a Volumen final de reacción 15 μ l

^b Buffer 10X: acetato de potasio 50 mM, Tris-acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, ditiotreitól 1 mM, pH 7.9 (NEBuffer 4, New England BioLabs)

^c BSA 10X: Albúmina Sérica Bovina (100 g/ml, New England BioLabs)

Tabla IV**Condiciones de reacción para la digestión con la enzima *Nci I***

| Reactivo | Volumen/Reacción ^a |
|-------------------------|-------------------------------|
| Agua Milli-Q estéril | 11.4 μ l |
| Buffer 10X ^b | 1.5 μ l |
| Enzima | 0.1 μ l (1 U) |
| Producto Amplificado | 2.0 μ l |

^a Volumen final de reacción 15 μ l.

^b Buffer 10X: Tris-HCl 20 mM pH 7.4, MgCl₂ 10 mM (React 8, GIBCO BRL)

2.5 Detección de mutaciones en el gen *rpoB* en aislamientos clínicos resistentes a RIF

2.5.1 Amplificación de un fragmento del gen *rpoB*

A partir del DNA genómico extraído de los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a RIF, mediante la PCR se amplificó un fragmento de 257 pb del gen *rpoB* que incluye la región hipervariable de 69 pb, utilizando los iniciadores polB5a y rpoB2659r (28) del estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics N.V., Ghent).

Los volúmenes de los reactivos utilizados para la PCR se muestran en la tabla V. Simultáneamente con los ensayos problema se incluyeron un testigo positivo (DNA de *M. tuberculosis* H37Ra) y uno negativo (en lugar de DNA se utilizó agua estéril). La mezcla de reacción de cada tubo se preparó a partir de un coctel de reacción al cual se le agregaron todos los reactivos (en el orden indicado en la tabla V) excepto el DNA. Posteriormente se le agregó el DNA problema a cada tubo y una gota de aceite mineral (Sigma, grado Biología Molecular), se centrifugaron brevemente los tubos a 16,000 X g (14,000 rpm) en una microcentrífuga 5415 C (Eppendorf) para bajar la mezcla que haya quedado en las paredes, se introdujeron al termociclador PTC 150 (MJ Research, Watertton USA) y se sometieron al programa de amplificación que se muestra en la tabla VI.

Se verificó la amplificación de la misma manera como se describió al final del punto 2.4.1., empleando el marcador pUC 18 + *Hae* III para determinar el tamaño de las bandas obtenidas.

Tabla V

**Reactivos empleados en los ensayos de PCR
de un fragmento del gen *rpoB***

| Reactivo | Concentración stock | Volumen/ Reacción ^a | Concentración final |
|--------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| AB ^b | 5 X | 5.0 µl | 1 X |
| NP ^c | 5 X | 5.0 µl | 1 X |
| MS ^d | 5 X | 5.0 µl | 1 X |
| H ₂ O Milli-Q | - | 8.9 µl | - |
| Taq DNA Polimerasa | 5 U/µl | 0.1 µl | 0.02 U/µl |
| DNA | 150 ng/µl | 1.0 µl | 6 ng/µl |

^a Volumen final de reacción 25 µl

^b Buffer de amplificación + dNTP's

^c Mezcla de oligonucleótidos + 0.01% azida de sodio (NaN₃)

^d Solución MgCl₂

Tabla VI

**Programa de temperaturas y tiempos utilizado en los ensayos de PCR
para el gen *rpoB***

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Observaciones |
|------|------------------|--------------|----------------------------|
| 1 | 95 | 5 | Desnaturalización inicial |
| 2 | 95 | 1 | Desnaturalización |
| 3 | 55 | 1 | Apareamiento |
| 4 | 72 | 1 | Extensión |
| 5 | - | - | Repetir pasos 2-4 30 veces |
| 6 | 72 | 10 | Extensión prolongada |

2.5.2 Hibridación del producto amplificado del gen *rpoB* empleando el estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB

Después de obtenida la amplificación, se realizaron las hibridaciones de los productos amplificados empleando el estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics N.V., Ghent) para determinar la presencia de mutaciones en la región de 69 pb del gen *rpoB* relacionadas con resistencia a RIF.

La hibridación se realizó mediante el siguiente procedimiento descrito por el estuche comercial INNO-LiPA Rif. TB:

Desnaturalización e hibridación: Se preparó un baño de agua en agitación a 62°C con tapa, se verificó la temperatura utilizando un termómetro calibrado. Se disolvieron los cristales de la solución de hibridación en un baño de agua que no excediera de 62°C. Usando pinzas se removió el número de tiras INNO-LiPA Rif.TB requeridas y se escribió con lápiz el número de identificación antes de la línea roja. Se colocaron el número requerido de carriles en el portacarriles. Se añadieron 10 µl de solución de desnaturalización en un extremo del carril y después 10 µl de producto amplificado mezclando cuidadosamente (pipeteando hacia arriba y abajo) y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 1 ml de la solución de hibridación e inmediatamente se colocó la tirilla con la marca roja hacia arriba. El portacarriles se colocó en el baño de agua a 62°C cerrando la tapa y se incubó por 30 min en agitación constante.

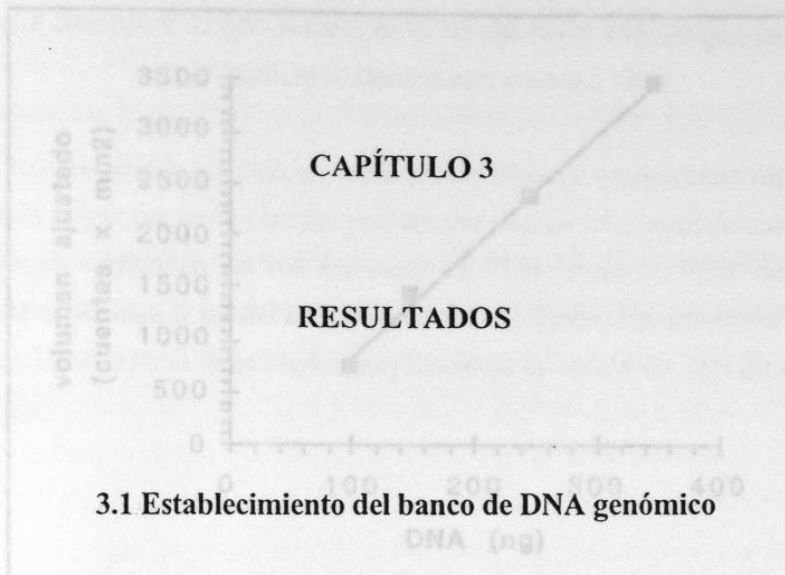
Lavado astringente: Después de la hibridación, se removió el portacarriles del baño de agua, se aspiró el líquido de los carriles empleando vacío y se añadió 1 ml de solución de lavado astringente, mezclando por rotación (manualmente) el portacarriles durante 20 s a temperatura ambiente, se aspiró la solución empleando vacío y se repitió este paso una vez más. Se añadió 1 ml de solución de lavado astringente y se incubó el portacarriles en el baño de agua a 62°C ± 0.5 por 10 min (con la tapa cerrada). Se diluyó la solución de lavado (1:5 en agua destilada) y la solución del Conjugado (1:100 en diluyente del conjugado) durante el lavado astringente, tomando en cuenta el número de muestras.

Desarrollo de color: Todas las incubaciones subsecuentes se llevaron a cabo de 20-30°C en un agitador. Se removió el portacarriles del baño de agua y se aspiró la solución empleando vacío. Posteriormente se lavaron por duplicado las tirillas durante 1

min usando 1 ml de solución de lavado diluida. Se añadió 1 ml de solución del conjugado diluida y se incubó 30 min. (Se diluyó el sustrato 1:100 en buffer del sustrato, 10 min antes de que terminara la incubación con el conjugado). Se lavaron por duplicado las tirillas durante 1 min usando 1 ml de solución de lavado diluida y una vez más con 1 ml de buffer del sustrato. Después se añadió 1 ml de solución del sustrato preparada y se incubó por 30 min en agitación constante. Para detener la reacción del desarrollo de color, se lavaron las tirillas con 1 ml de agua destilada en agitación constante, por un mínimo de 5 min. Por último se removieron las tirillas de los carriles con unas pinzas y se colocaron en papel absorbente, una vez secas por completo, se leyeron los resultados.

2.7 Determinación de la frecuencia de mutaciones de los genes *katG* y *rpoB*.

Después de la detección de mutaciones en los genes *katG* y *rpoB* en los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH y/o RIF, se determinó la frecuencia de estas mutaciones respecto al número total de aislamientos clínicos procesados para cada método de detección (58 aislamientos resistentes a INH y 58 aislamientos resistentes a RIF). Posteriormente, estas frecuencias se compararon estadísticamente con las reportadas en otras poblaciones mediante una prueba de conformidad de ji-cuadrada con $\alpha = 0.05$



En la figura 6 se muestra un gel de agarosa al 0.8% con las bandas de DNA de *E. coli* con las cuales se realizó la recta de calibración (figura 7) y las bandas de DNA de *M. tuberculosis*. A las muestras de DNA cuya concentración no caía dentro de la recta de calibración, se les hizo una dilución mayor y se volvieron a cuantificar. La cantidad de DNA obtenida de las extracciones varió desde 20 ng/μl hasta 3 μg/μl. La calidad varió también, puesto que se obtuvieron algunas muestras de DNA degradado (figura 8), el cual se observa como un barrido hacia abajo a partir de donde debería estar la banda de DNA.

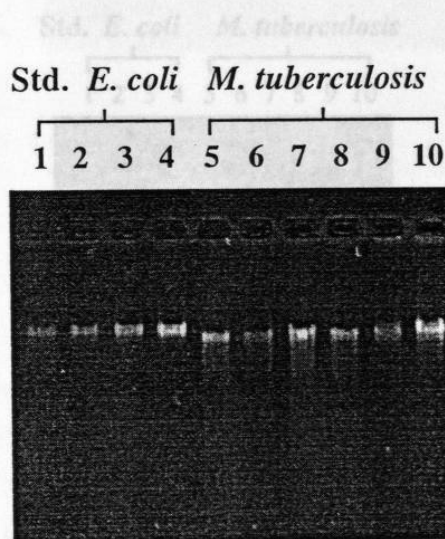


Figura 6. Gel de agarosa 0.8% para evaluar la extracción de DNA de *M. tuberculosis*. Carriles 1-4: 100, 150, 250 y 350 ng de DNA de *E. coli*, respectivamente. Carriles 5-10: DNA de *M. tuberculosis*.

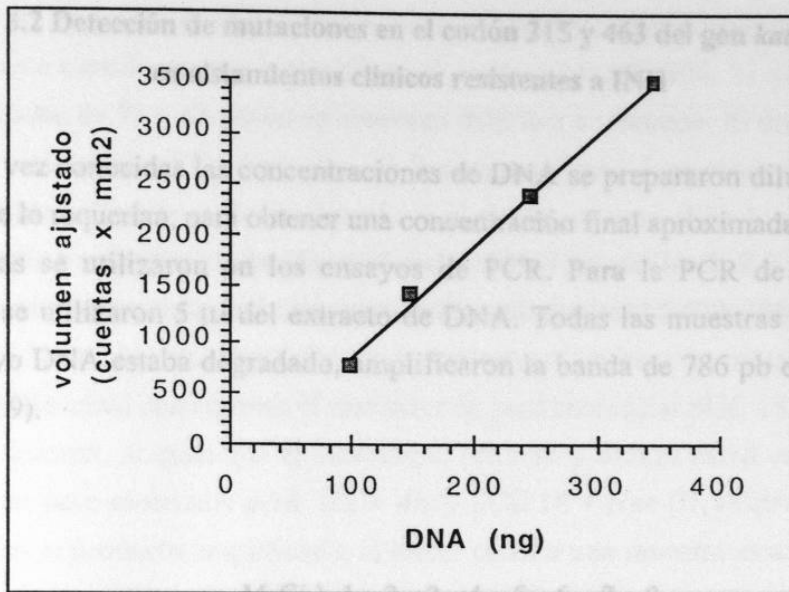


Figura 7. Recta de calibración de DNA de *E. coli*. Se graficó la cantidad de DNA colocados en el gel (100, 150, 250 y 350 ng) vs la intensidad (cuentas x mm²) de las bandas del gel que se muestra en la figura 6. $r^2 = 0.9976$, $m = 10.80$, $b = -256.56$

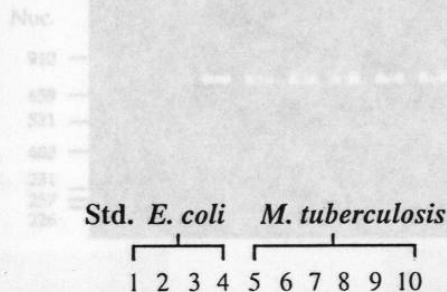


Figura 9. Gel de agarosa 1.5% p... peso molecular pBR 322 + *Alu* I... (186 pb).

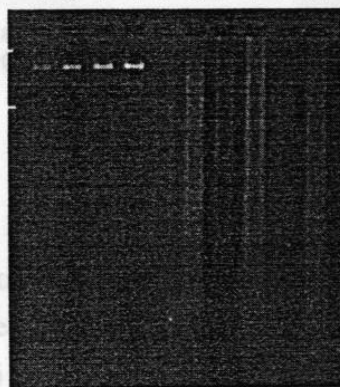


Figura 8. Gel de agarosa 0.8% donde se observa la calidad del DNA aislado de *M. tuberculosis*. Carril 1-4: 82.5, 165, 247.5 y 288.75 ng de DNA de *E. coli*, respectivamente. Carriles 5-10: DNA degradado de *M. tuberculosis*.

3.2 Detección de mutaciones en el codón 315 y 463 del gen *katG* en aislamientos clínicos resistentes a INH

Una vez conocidas las concentraciones de DNA se prepararon diluciones de las muestras que lo requerían, para obtener una concentración final aproximadamente de 150 ng/ μ l y éstas se utilizaron en los ensayos de PCR. Para la PCR de las muestras degradadas se utilizaron 5 μ l del extracto de DNA. Todas las muestras de DNA, aún aquellas cuyo DNA estaba degradado, amplificaron la banda de 786 pb esperada en la PCR (figura 9).

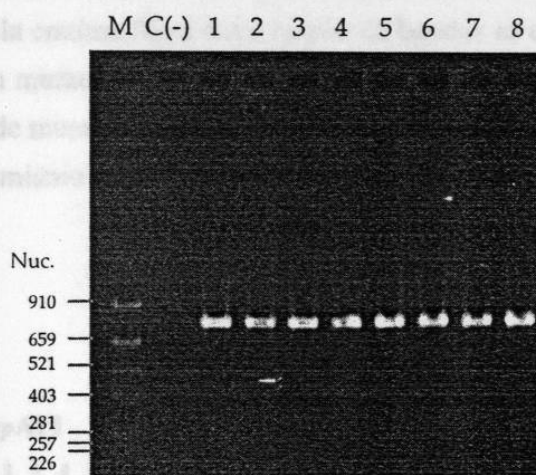


Figura 9. Gel de agarosa 1.5% para evaluar la amplificación del gen *katG*. Carril M: Marcador de peso molecular pBR 322 + *Alu* I. Carril C(-): Control negativo. Carriles 1-8: Productos amplificados (786 pb).

Al digerir el producto amplificado de 786 pb del gen *katG* con las enzimas *MspA1* I y *Nci* I, el patrón de bandas obtenido se observó con claridad (figura 9) y en ningún caso se tuvo duda de si la muestra presentaba o no las 2 mutaciones analizadas.

En la figura 10 se muestran 2 geles de agarosa al 2.5% teñidos con bromuro de etidio (2 μ g/ml) durante 10 min, con los patrones de bandas de los productos de digestión con las enzimas *MspA1* I y *Nci* I. En el gel correspondiente a la digestión con la enzima *MspA1* I, el primer carril corresponde al marcador de peso molecular pBR 322 + *Alu* I, el segundo al producto amplificado, el tercero a una muestra de *M. tuberculosis*

susceptible (H37Ra) a INH digerida con la enzima *MspA1 I* cuyo patrón de bandas es el correspondiente cuando no hay mutación en el codón 315:343, 306, 71 y 66 pb, de las cuales las bandas de 71 y 66 pb no se observan debido a su tamaño. El carril 1 al 6 son de muestras resistentes a INH digeridas con la enzima *MspA1 I*; se observa que el carril 3, 5 y 6 presentan el patrón de bandas igual que el del tercer carril (Ra), lo que indica que estas muestras no presentan mutación en el codón 315. Los carriles 1, 2 y 4 presentan el patrón de bandas esperado cuando hay mutación en el codón 315:409, 306 y 71 pb (esta última banda no se observa), por lo que estas muestras si presentan mutación en dicho codón. El último carril corresponde al marcador de peso molecular pUC 18 + *Hae III*. En el gel de la derecha, al igual que el anterior, el primero y último carril corresponden a marcadores de peso molecular pBR 322 + *Alu I* y pUC 18 + *Hae III*, respectivamente, el segundo carril al producto amplificado, el tercer carril a una muestra susceptible a INH (H37Ra) digerida con la enzima *Nci I* cuyo patrón de bandas es característico cuando el codón 463 no presenta mutación:294, 253, 204 y 33 pb, esta última no se observa. Los carriles del 1 al 6 son de muestras resistentes a INH digeridas con la enzima *Nci I* y cuyo patrón de bandas es el mismo al del tercer carril (Ra), es decir que no presentan mutación en el codón 463.

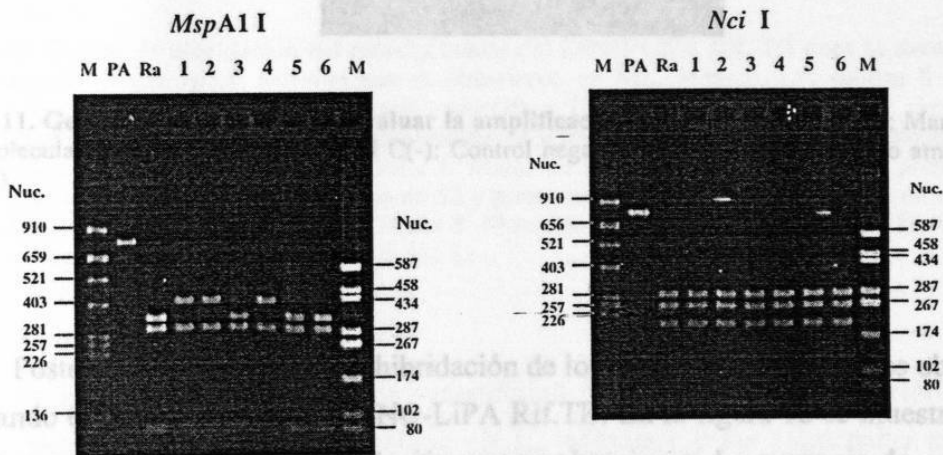


Figura 10. Gel de agarosa al 2.5% para evaluar la digestión analítica de las muestras resistentes a INH. Ambos gels. Primer carril: pBR 322 + *Alu I*. Carril PA: Producto amplificado. Último carril: pUC 18 + *Hae III*. Gel de la izquierda. Carril Ra: *M tuberculosis* H37Ra + *MspA1 I*. Carriles 1-6: Muestras resistentes a INH + *MspA1 I*. Gel de la derecha. Carril Ra: *M tuberculosis* H37Ra + *Nci I*. Carriles 1-6: Muestras resistentes a INH + *Nci I*.

3.3 Detección de mutaciones en el gen *rpoB* en aislamientos clínicos resistentes a RIF

Al igual que en el punto anterior, una vez conocidas las concentraciones de DNA se prepararon diluciones con TE 1X pH 8.0 de las muestras que lo requerían, para obtener una concentración final aproximadamente de 150 ng/μl y éstas se utilizaron en los ensayos de PCR. Para la PCR de las muestras degradadas se utilizaron 5 μl del extracto de DNA. Todas las muestras de DNA amplificaron la banda de 257 pb esperada al realizar la PCR (figura 11), aún aquellas muestras de DNA degradado.

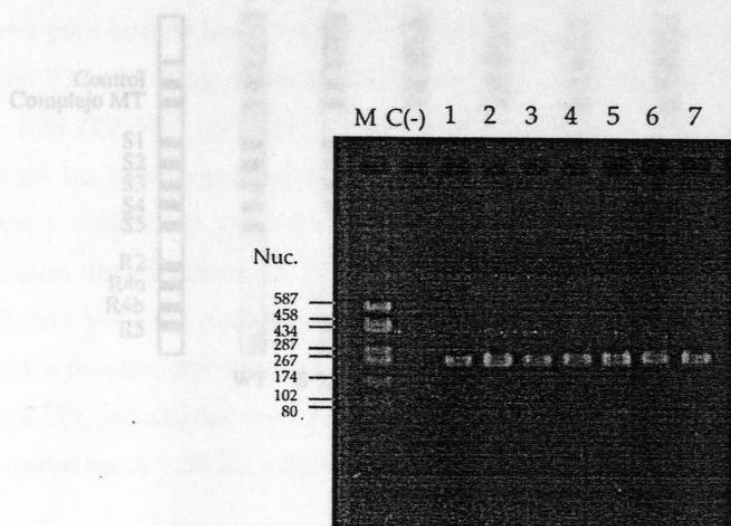


Figura 11. Gel de agarosa 1.5% para evaluar la amplificación del gen *rpoB*. Carril M: Marcador de peso molecular pUC 18 + *Hae* III. Carril C(-): Control negativo. Carriles 1-7: Producto amplificado (257 pb).

Posteriormente se realizó la hibridación de los productos amplificados obtenidos empleando el estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB. En la figura 12 se muestra todos los patrones de las tirillas de hibridación que se obtuvieron. La ausencia de cualquier sonda S tipo silvestre indica la presencia de una mutación en la región de DNA que abarca la sonda S. La tirilla 1 presenta un patrón tipo silvestre, el de la tirilla 2 corresponde a la mutación S531L en donde se observa la ausencia de la banda S5 y la presencia de la R5 correspondiente a esa mutación específica; la tirilla 3 y 4 pertenecen a las mutaciones H526Y y H526D, respectivamente, se observa la ausencia de la banda S4 y la presencia de las bandas R4a y R4b correspondientes a esas mutaciones específicas,

respectivamente. En la tirilla 5 se observa la ausencia de la banda S2 y la presencia de la R2 que corresponde a la mutación D516V. Las tirillas 6, 7 y 8 no presentan las bandas S1, S2, y S3, respectivamente, lo que indica la presencia de una mutación en esa región de DNA de igual manera relacionadas con resistencia a RIF. En la tirilla 9 se observa la ausencia de las bandas S1 y S2, lo que indica la presencia de mutaciones en estas regiones de DNA; además, también se observa la ausencia de la banda S5 y la presencia de la R5 por lo que otra de las mutaciones que presenta es la S531L.

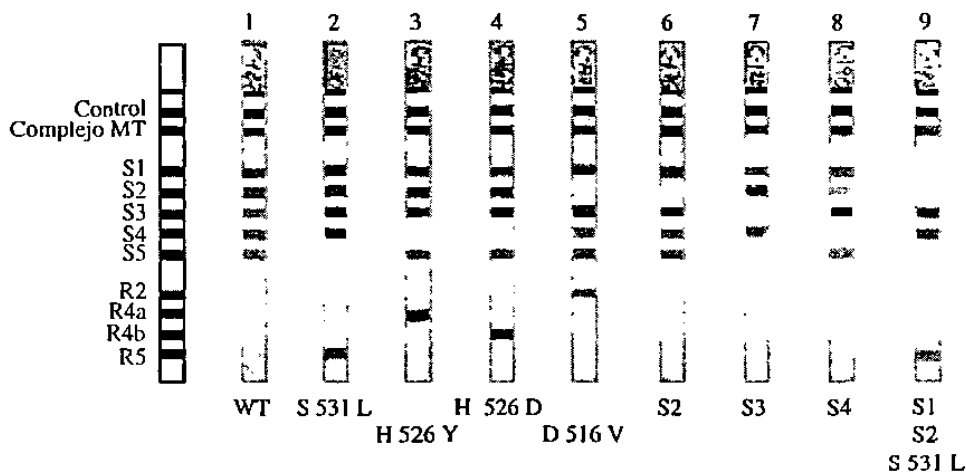


Figura 12. Tirillas de hibridación del estuche comercial INNO-LiPA Rif. TB para la detección de mutaciones en el gen *rpoB*. Patrones que se obtuvieron en N.L. México. Las sondas S son tipo silvestres, las sondas R presentan una mutación específica. Tirilla 1: Patrón tipo silvestre, presenta las 5 sondas S; Tirilla 2: Mutación S 531 L, ausencia de S5 y presencia de R5; Tirilla 3: Mutación H 526 Y, ausencia de S4 y presencia de R4a; Tirilla 4: Mutación H 526 D, ausencia de S4 y presencia de R4b; Tirilla 5: Mutación D 516 V, ausencia de S2 y presencia de R2; Tirilla 6: Mutación en región de S2; Tirilla 7: Mutación en región de S3; Tirilla 8: Mutación en región de S4; Tirilla 9: Mutación en región de S1 y S2, además de la mutación S 531 L.

En la tabla VII se presenta la sensibilidad del estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB obtenida en el presente trabajo (N.L., México) y las reportadas en otras poblaciones. De las 58 muestras de aislamientos clínicos resistentes a RIF que se procesaron, en 57 se detectaron mutaciones, es decir presentaron un patrón característico y solamente una muestra presentó un patrón tipo silvestre, de lo cual se calcula un 98% de sensibilidad del estuche para detectar mutaciones en los 69 pb del gen *rpoB* en aislamientos clínicos resistentes a RIF.

3.4 Determinación de la frecuencia de mutaciones en los genes *katG* y *rpoB*

De los 58 aislamientos clínicos resistentes a INH procesados, 31 presentaron mutación en el codón 315, lo que corresponde a un 53.4%, pero ninguna muestra presentó mutación en el codón 463 (tabla VIII).

Las 58 muestras analizadas resistentes a RIF fueron positivas para la banda de la tirilla correspondiente al complejo *M. tuberculosis* (figura 12), comprobando la identificación previa de la micobacteria. La mayoría de las muestras (86.2%) fueron positivas para una de las 4 sondas R (tabla IX), siendo las mutaciones más frecuentes en el codón 531 (55.2%), produciendo un cambio de Serina por Leucina (S531L), y en el codón 526 (22.4%) originándose un cambio de Histidina por Tirosina (H526Y). El 15.5% de las muestras presentaron al menos una señal negativa de las sondas S tipo silvestre y solamente una muestra de las 58 analizadas (1.8%) presentó un patrón de hibridación tipo silvestre. En la tabla IX y las figuras 13 y 14 se muestra la frecuencia de mutaciones y de los patrones de las tirillas que se obtuvieron en N.L. (México) y las reportadas en otras poblaciones. La muestra que presentó tres patrones juntos (tirilla 9 de la figura 12), se tomaron en cuenta cada uno de los patrones al determinar las frecuencias de las mutaciones y de los patrones de las tirillas.

Tabla VII

Comparación de la sensibilidad del estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB obtenida en N.L. (México) y la descrita para otras poblaciones

| Población | Año | Número de muestras | Sensibilidad (%) INNO-LiPA Rif. TB | Referencia |
|--------------|-----|--------------------|---------------------------------------|------------|
| N.L., México | '98 | 58 | 98 | - |
| EE.UU. | '98 | 118 | 96 | (38) |
| N.Y.-Texas | '94 | 121 | 97 | (26) |
| N.Y. | '97 | 51 | 94 | (29) |
| Grecia | '98 | 17 | 94 | (39) |
| Bélgica-Rum. | '97 | 35 | 100* | (40) |
| Asia | '97 | 56 | 100* | (40) |
| Africa | '97 | 80 | 100* | (40) |

* Diferencias significativas con N.L., México a $p < 0.05$

Tabla VIII

Comparación de la frecuencia de las mutaciones en los codones 315 y 463 que se obtuvieron en N.L. (México) y las descitas para otras poblaciones

| Población | Año | No. muestras | Mutación codón 315 | Mutación codón 463 | Mutación codones 315 y 463 | Ref. |
|------------|-----|--------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|------|
| N.L., Méx | '98 | 58 | 53.4 | 0 | 0 | - |
| Diversas | '96 | 34 | 32.3* | 17.6* | 20.6* | (12) |
| Filadelfia | '97 | 27 | 33.3* | 18.5* | 11.1* | (41) |
| Holanda | '96 | 48 | 52.1 | 16.6* | 8.3* | (12) |
| Africa | '97 | 87 | 65.5* | 4.6* | 2.3 | (42) |

* Diferencias significativas con N.L., México a $p < 0.05$

Tabla IX

Comparación de la frecuencia de las mutaciones y patrones INNO-LiPA Rif.TB que se obtuvieron en N.L. (México) con los encontrados en otras poblaciones

| Patrón | Mutación <i>rpoB</i> | Frecuencia (%) | | | | | | | |
|--------|-------------------------|-------------------------|--------|----------|------|--------|---------|-------|--------|
| | | N.L., Mex. ^a | EE.UU. | N.Y.-Tex | N.Y. | Grecia | Bel-Rum | Asia | Africa |
| R5 | S 531 L | (32) 55.2 | 36.6* | 29* | 33* | 52.9 | 60.0 | 35.7* | 42.5* |
| R4a | H 526 Y | (13) 22.4 | 25.0 | 32* | 39* | 0* | 5.7* | 12.5* | 7.5* |
| R4b | H 526 D | (4) 6.9 | 5.8 | 7 | 4 | 17.6* | 8.6 | 5.4 | 16.3* |
| R2 | D 516 V | (1) 1.7 | 7.5* | 0* | 4 | 5.9 | 11.4* | 7.1* | 7.5* |
| ΔS1 | | (1) 1.7 | 3.3 | 13* | 6 | 0* | 0* | 0* | 2.5 |
| ΔS2 | | (2) 3.4 | 4.2 | 8 | 4 | 5.9 | 2.9 | 5.4 | 1.3 |
| ΔS3 | | (3) 5.2 | 1.6* | 0* | 0* | 0* | 2.9 | 8.9 | 1.3* |
| ΔS4 | | (3) 5.2 | 9.2 | 4 | 0* | 0* | 5.7 | 8.9 | 13.8* |
| ΔS5 | | (0) 0 | 2.5 | 4* | 4* | 17.6* | 2.9 | 16.1* | 7.5* |
| WT | | (1) 1.7 | 4.2 | 3 | 6 | 5.9 | 0* | 0* | 0* |

^a La columna de la izquierda, entre paréntesis, corresponde al número de muestras. Solo una muestra presentó 3 patrones juntos.

* Diferencias significativas con N.L., México a $p < 0.05$

Nota. Los datos corresponden a las referencias de la tabla VII.

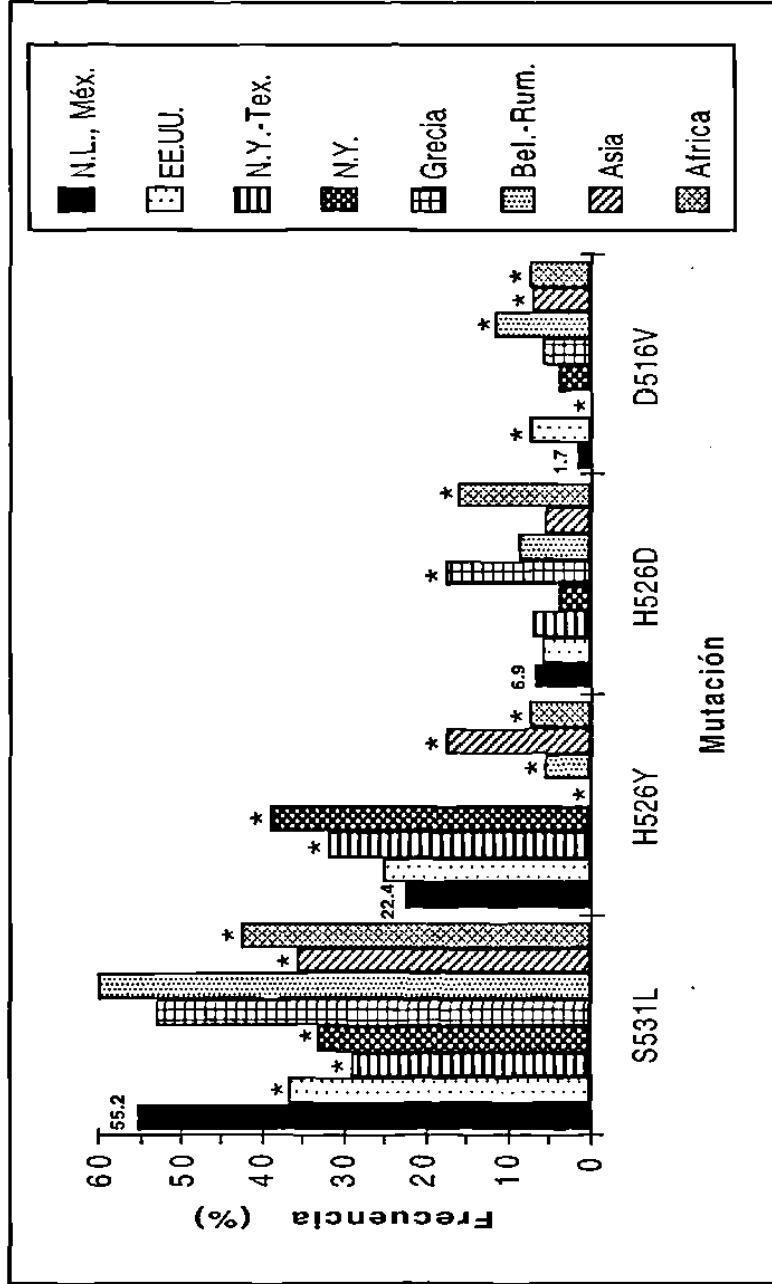


Figura 13. Comparación de la frecuencia de mutaciones obtenidas en N.L. (México) con las descritas por otras poblaciones.
 * Diferencias significativas con N.L., México a $p < 0.05$

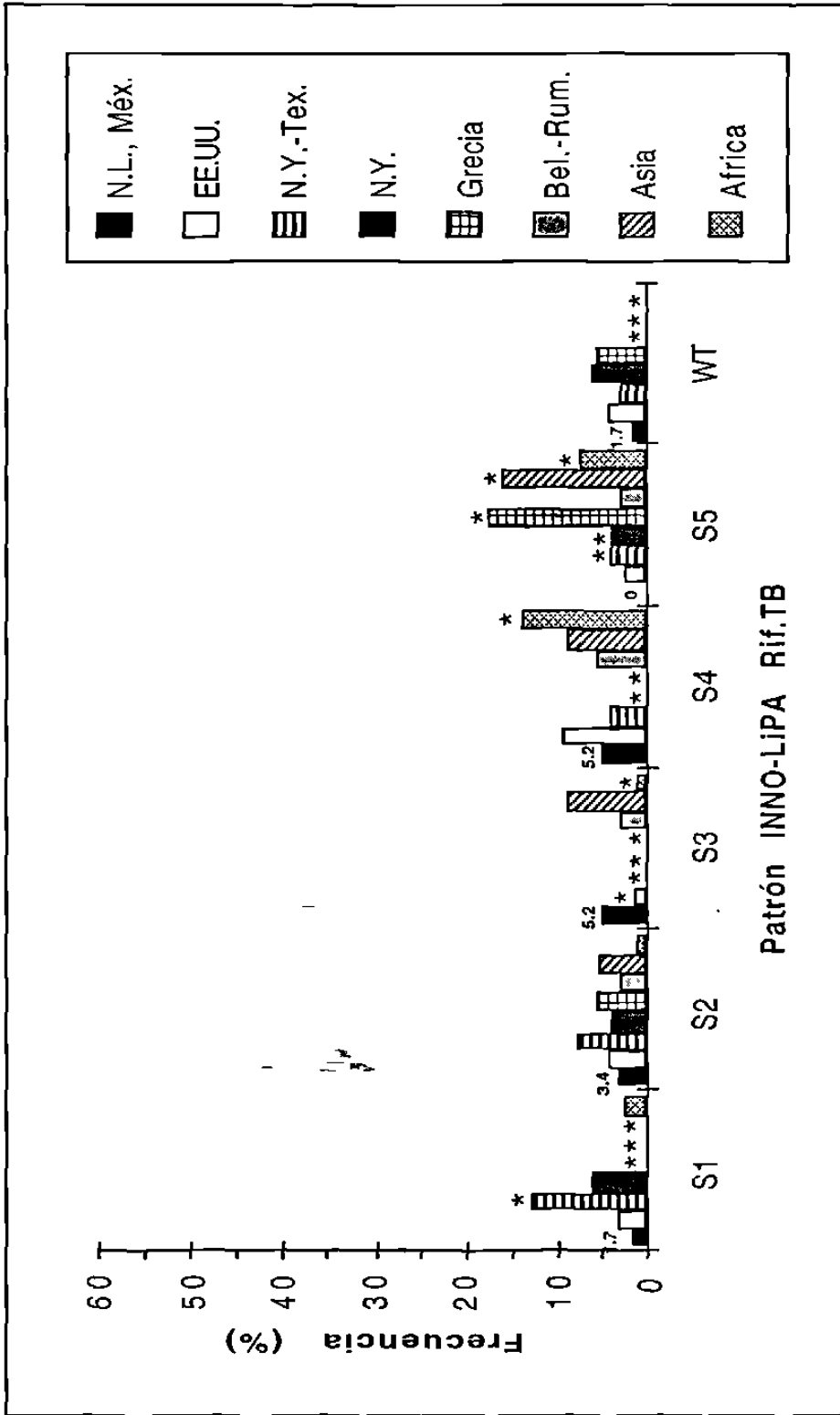


Figura 14. Comparación de los patrones de las tirillas INNO-LIPA Rif.TB obtenidos en N.L. (México) con los encontrados en otras poblaciones. * Diferencias significativas con N.L., México a $p < 0.05$

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

La técnica de hibridación del estuche comercial es sencilla y rápida de realizar, una vez ajustado el nivel del agua, la agitación y la temperatura del baño de agua a 62°C. Durante el proceso hay que controlar la temperatura debido a que disminuye al abrir la tapa del baño de agua, por lo que se tiene que introducir el portacarriles al baño relativamente rápido y cuidando que las gotas de agua condensadas en la tapa no caigan en los carriles ya que éstos van destapados. Por la misma razón también se debe controlar la agitación del baño, de manera que no se introduzca agua a los carriles y que además la agitación sea adecuada (que las tiras se muevan a lo largo del carril), este proceso es muy importante para una buena hibridación, junto con el control estricto de la temperatura durante el lavado astringente de las tirillas.

La sensibilidad del estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB para la detección de mutaciones del gen *rpoB* obtenida de las muestras analizadas en esta población (N.L., México) es muy buena (98%), y a su vez no presenta diferencia significativa con la sensibilidad obtenida en algunas poblaciones (tabla VII), pero con otras poblaciones sí presenta diferencia significativa, aunque esta diferencia es muy pequeña y puede ser debida a un artificio estadístico causado por el número de muestras analizadas. El 2% de las muestras analizadas que presentaron un patrón tipo silvestre, indica que algunos aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a RIF presentan mecanismos de resistencia diferentes al relacionado con mutaciones en la región de 69 pb del gen *rpoB*.

Al comparar la frecuencia de mutaciones en los codones 315 y 463 del gen *katG* con las reportadas en otras poblaciones (tabla VIII), se encontró una diferencia significativa con cada una de ellas. Solamente entre la frecuencia de la mutación en el codón 315 obtenida en este trabajo y la reportada en Holanda, no hubo diferencia significativa. Sin embargo, la mutación en este codón es la que se presentó con mayor frecuencia en todas las poblaciones comparadas, excepto N.Y. La ausencia de mutación en el codón 463 de las muestras procesadas concuerdan con lo publicado por Shim *et al.*

(24), donde mencionan que la mutación en este codón podría ser un polimorfismo no relacionado con la resistencia a INH.

Al hacer una comparación de cada una de las mutaciones en las diversas poblaciones, se encontraron diferencias significativas entre algunas de ellas (figuras 12 y 13), por lo que probablemente existen diferentes mecanismos de adquisición de mutaciones en el gen *rpoB* en las distintas áreas geográficas debido tal vez a factores ambientales específicos, tal como lo sugieren Matsiota-Bernard *et al.* (39). En este estudio la mutación S531L se presentó con mayor frecuencia, coincidiendo con lo reportado en las diversas poblaciones, excepto N.Y., en donde se reporta una mayor frecuencia de la mutación H526Y.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Es probable que la mutación en el codón 463 no esté involucrada con la resistencia de *M. tuberculosis* a INH según los datos obtenidos y los reportes recientes.
- La técnica de hibridación del estuche comercial INNO-LiPA Rif.TB es sencilla, rápida y presenta una sensibilidad muy buena (98%) en el Noreste de México para la detección de mutaciones en el gen *rpoB* relacionadas con la resistencia a RIF.
- Las muestras resistentes a INH que no presentaron mutación en el codón 315 del gen *katG*, pudieran deber su resistencia a INH a otras mutaciones en este gen o en otros genes como *inhA* o *ahpC*. Del mismo modo las muestras resistentes a RIF que presentaron un patrón tipo silvestre en los 69 pb del gen *rpoB*, pudieran deber su resistencia a RIF por otros mecanismos.
- Probablemente existen diferentes mecanismos de adquisición de mutaciones en el gen *rpoB* en las distintas áreas geográficas debido tal vez a factores ambientales específicos.
- Las mutaciones encontradas en los genes *katG* y/o *rpoB* de *M. tuberculosis*, pueden ser utilizadas como marcadores genéticos para detectar rápidamente aislamientos clínicos resistentes a INH en un 53% de los casos y/o RIF en un 98% de los casos del Noreste de México.

REFERENCIAS

1. Murray, C.J.L., K. Styblo, A. Rouillon. 1990. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. *Bull Int Union. Tuberc Lung Dis.* 65:6.
2. <http://www.who.com>
3. Dowling, P.T. 1991. Return of tuberculosis: screening and preventive therapy. *Am. Fam. Physician* 43(2):457-467.
4. Jereb, J.A., G.P. Kelly, S.W. Dedeo *et al.* 1991. Tuberculosis morbidity in the United States: final data, 1990, in CDC surveillance summaries. *MMWR.* 40:23.
5. NOM-006-SSA2-1993.
6. Ahern, H. 1994. Molecular mechanisms of antibiotics may yield to MDR-TB. *Advance for Medical Laboratory Professionals.* 6(20):8-9.
7. Santaella, S.A., S.B. Campos, y G.A. Flores. 1997. la Farmacorresistencia de la Tuberculosis en México. *Epidemiología.* 14(2):1-3.
8. Sifuentes-Osornio, J., L.A. Ponce-de-León, F.E. Camacho-Mezquita, J.M. Bobadilla-del-Valle, M.L. Infante-Suárez, N. Ramírez-Fernández, L. Hernández-Gómez, A.M. Nelson. 1995. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes mexicanos. I. Características clínicas y factores de riesgo. *Rev. Invest. Clin.* 47(4):273-281.
9. Haas, D.W., R.M. DesPrez. Tratamiento y asistencia actuales. En *Tuberculosis.* M.D. Rossman, R.R. MacGregor (Eds). McGraw Hill-Interamericana. 1996. pp. 205-228.
10. Inderlied, C.B., M. Salfinger. Antimicrobial agents and susceptibility test: mycobacteria. En *Manual of Clinical Microbiology.* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Tenover (Eds). ASM Press 6a. Edición, Washington, D.C. 1995. pp. 1385-1404.
11. Middlebrook, G. 1954. Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercule bacili. *Am Rev. Tuberc.* 69:471-472.

12. Musser, J.M., V. Kapur, D.L. Williams, B.N. Kreiswirth, D.V. Soolingen, y J. Embden. 1996. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: Restricted array of mutations associated with drug resistance. *J.Infect. Dis.* 173:196-202.
13. Rouse, D.A., Z. Li, G. Bai, y S.L. Morris. 1995. Characterization of the *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39(11):2472-2477.
14. Hedgecock, L.W., I.O. Faucher. 1957. Relation of pyrogallol-peroxidative activity to isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Tuberc.* 75:670-674.
15. Zhang, Y., B. Heym, B. Allen, D. Young, y S. Cole. 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature.* 358:591-593.
16. Heym, B., Y. Zhang, S. Poulet, D. Young, y S.T. Cole. 1993. Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 175:4255-4259.
17. Blanchard, J.S. 1996. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Biochem.* 65:215-239.
18. Telenti, A. 1997. Genetics of drug resistance in tuberculosis. *Clinics in chest medicine.* 18: 55-64.
19. Morris, S.L., J. Nair, y D.J. Rouse. 1992. The catalase-peroxidase of *Mycobacterium intracellulare*: nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli*. *J. Gen Microbiol.* 138:2363-2370.
20. Stoeckle, M.Y., L. Guan, N. Riegler, I. Weitzman, y B. Kreiswirth. 1993. Catalase-peroxidase gene sequences in isoniazid-sensitive and resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York City. *J. Infect. Dis.* 168:1063-1065.
21. Altamirano, M., J. Marostenmaki, A. Wong, M. FitzGerald., W.A. Black, y J.A. Smith. 1994. Mutations in the catalase-peroxidase gene from Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Infect. Dis.* 169:1162-1165.
22. Morris, S., G.-H. Bai, P. Suffys, L. Portillo-Gómez, M. Fairchok, y D. Rouse. 1995. Molecular mechanism of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 171:954-960.

23. Kapur, V., L.-L. Li, M.R. Hamrick, B.B. Plikaytis, T.M. Shinnick, A. Telenti, W.R. Jacobs Jr., A. Banerjee, S. Cole, K.Y. Yuen, *et al.* 1995. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 119(2):131-138.
24. Shim, T.S., C.G. Yoo, S.K. Han, Y.S. Shim, Y.W. Kim. 1997. Isoniazid resistance and the point mutation of codon 463 of *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Korean Med. Sci.* 12(2):92-98.
25. Telenti, A., D.H. Persing. 1996. Novel strategies for the detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol.* 147:73-79.
26. Kapur, V., L.-L. Li, S. Iordanescu, M.R. Hamrick, A. Wanger, B.N. Kreiswirth, J.M. Musser. 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase β subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City. *J. Clin. Microbiol.* 32:1095-1098.
27. Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M.J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, T. Bodmer. 1993. Detection of rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 341:647-650.
28. Musser, J.M. 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:496-514.
29. Cooksey, R.C., G.P. Morlock, S. Glickman, J.T. Crawford. 1997. Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *J. Clin. Microbiol.* 35:1281-1283.
30. Warren, N.G., B.A. Body. Bacteriología y Diagnóstico. En *Tuberculosis*. M.D. Rossman, R.R. MacGregor (Eds). McGraw Hill-Interamericana. 1996. pp. 37-55.
31. Jacobs Jr., W.R., R.G. Barletta, R. Udani, J. Chan, G. Kalut, G. Sosne, T. Kieser, G.J. Sarkis, G.F. Hatfull, B.R. Bloom. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science.* 1993. 260:819-822.
32. Garza-González E., M. Guerrero-Olazarán, R. Tijerina-Menchaca, J.M. Viader-Salvadó. 1997. Determination of drug susceptibility *Mycobacterium tuberculosis* through mycolic acid analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35(5):1287-1289.

33. Garza-González E., M. Guerrero-Olazarán, R. Tijerina-Menchaca, J.M. Viader-Salvadó. Susceptibilidad a antifímicos de *Mycobacterium tuberculosis* mediante índice de ácidos micólicos. XV Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L. (México). Octubre de 1997.
34. Reyes-Ruiz, J.M. Diseño de una estrategia para detectar las mutaciones en los codones 315 y 463 del gen *katG*, en muestras de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* del Noreste de México, resistentes a isoniacida. Tesis de Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.A.N.L. Monterrey, N.L. (México). Febrero 1997-junio 1998.
35. Balandrano-Campos, S., G. Anzaldo-Flores, G.P. Peña-Flores y X. Betancourt-Morillo. 1996. Manual de procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR 18: Tuberculosis. A. Escobar-Gutiérrez (Ed). Secretaría de Salud, Secretaría de Agricultura y Ganadería y Desarrollo Rural, Organización Panamericana de la Salud, México, D.F.
36. Garza-González E., M. Guerrero-Olazarán, R. Tijerina-Menchaca, J.M. Viader-Salvadó. 1998. Identification of mycobacteria by mycolic acid pattern. Archives of Medical Research. (En impresión).
37. Kulski, J.K., T. Pryce. 1996. Preparation of mycobacterial DNA from blood culture fluids by simple alkali wash and heat lysis method for PCR detection. J. Clin. Microbiol. 34(8):1985-1991.
38. Williams, D.L., L. Spring, L. Collins, L.P. Miller, L.B. Heifets, P.R.J. Gangadharam, T.P. Gillis. 1998. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifampicin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 42(7):1853-1857.
39. Matsiota-Bernard, P., G. Vrioni, E. Marinis. 1998. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. J. Clin. Microbiol. 36(1):20-23.
40. Rossau, R., H. Traore, H. Beenhouwer, W. Mijs, G. Jannes, P. Rijk, F. Portaels. 1997. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob. Agents Chemother. 41(10):2093-2098.

41. Nachamkin, I., C. Kang, M.P. Weinstein. 1997. Detection of resistance to isoniazid, rifampin, and streptomycin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by molecular methods. *Clinical Infectious Diseases*. 24:894-900.
42. Haas, W.H., K. Schilke, J. Brand, B. Amthor, K. Weyer, P.B. Fourie, G. Bretzel, V. Sticht-Groh, H.J. Bremer. 1997. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(7):1601-1603.

APÉNDICE

Preparación de reactivos

Si no se especifica lo contrario, las soluciones deben ser esterilizadas en una autoclave a 15 lb/in² durante 15 min.

Los reactivos que no se especifica la casa comercial, son de Sigma con grado Biología Molecular.

Acetato de sodio 3 M, pH 5.2

Disolver 12.3045 g de acetato de sodio en agua destilada, ajustar el pH con ácido acético glacial y aforar a 50 ml.

Agarosa 0.8%, 1.5%, 2.5%

Pesar 0.8 g, 1.5 g, 2.5 g, respectivamente, agregar 100 ml de TBE 1X pH 8.0 y fundir.

Bromuro de etidio 2 µg/ml

Mezclar 60 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml en 299.940 ml de agua milli-Q estéril, almacenarlo en un frasco ámbar. No esterilizar.

C:AI (Cloroformo-Alcohol isoamílico) 24:1

Mezclar 24 ml de cloroformo (Merck, grado analítico) y 1 ml de alcohol isoamílico. Almacenar a -20C. No esterilizar.

EDTA 0.25 M, pH 8.0 (Stock)

Disolver 4.653 g de Na₂EDTA.2H₂O en agua milli-Q, ajustar el pH de la solución con NaOH y aforar a 50 ml.

Etanol al 70%

Mezclar 35 ml de etanol (Merck, grado analítico) y 15 ml de agua milli-Q estéril. Almacenar a -20°C. No esterilizar.

Fenol saturado

El fenol debe ser redestilado para remover productos de oxidación como quinonas que pueden causar el rompimiento de los enlaces fosfodiéster o entrecruzamientos de RNA y DNA.

Destilación: Se funde el fenol a 68°C. Se procede a destilarlo si su aspecto al estar fundido no es cristalino (el fenol destila a una temperatura de 180°C, es recomendable no conectar agua circulante porque el fenol puede cristalizarse en el mismo refrigerante). El fenol que va destilando se puede recibir en un pequeño volumen de Tris-HCl 0.5 M para evitar su cristalización.

Saturación: (Antes de usar el fenol debe ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 debido a que el DNA puede quedar dentro de la fase orgánica si el pH del fenol es ácido). Agregar 8-hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1 %. Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8, agitar durante 24 hrs en el cuarto frío. Dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o un embudo de separación. Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M pH 8.0. Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 conteniendo β-mercaptoetanol a una concentración final de 0.2 %. La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco oscuro a -20°C.

Jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25 %, xilencianol 0.25 %, glicerol 30 %)

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3.0 ml de glicerol (Merck, grado analítico) en agua milli-Q estéril, aforar a 10 ml. No esterilizar.

Proteinasa K 10 mg/ ml

Disolver 100 mg de Proteinasa K en 10 ml de Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Hacer alicuotas de 100 µl y almacenarlas a -20°C.

RNAse 10 mg/ ml

Disolver 50 mg de RNAse en 5 ml de buffer: Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 15 mM. Hacer alicuotas de 100 µl y almacenarlas a -20°C.

SDS 1 % (Dodecil sulfato de sodio)

Disolver poco a poco 1 g de SDS en 100 ml de agua destilada.

TBE 20X (Tris-base 1.78 M, ácido bórico 1.78 M, EDTA 0.04 M pH 8.0)

Disolver 864 g de tris-base y 440 g de ácido bórico en 320 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 y en agua milli-Q, aforar a 4 lt y esterilizar.

TBE 1X (Tris-base 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 2 mM pH 8.0)

Mezclar 50 ml de TBE 20X pH 8.0 en agua milli-Q, aforar a 1 lt. No esterilizar.

TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM), pH=8.0

Mezclar 1 ml de Tris base 0.5 M y 200 μ l de EDTA 0.25 M en agua destilada, ajustar el pH con HCl ó NaOH diluidos y aforar a 50 ml con agua destilada.

Tris base 0.5 M, pH 8.0 (Stock)

Disolver 3.0275 g de Tris base en agua milli-Q, ajustar el pH de la solución con HCl, aforar a 50 ml.

Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, Tween 80 al 0.1%, pH 8.0

Mezclar 1 ml de Tris base 0.5 M, 2 ml de EDTA 0.25 M, 50 μ l de Tween 80 y 40 ml de agua milli-Q, ajustar el pH a 8.0 con HCl ó NaOH diluidos y aforar a 50 ml con agua milli-Q.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Claudia Maribel Luna Aguirre

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular
e Ingeniería Genética

Tesis: DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MUTACIONES EN LOS
GENES *katG* Y/O *rpoB* DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *M. tuberculosis*
RESISTENTES A ISONIACIDA Y/O RIFAMPICINA DEL NORESTE DE
MÉXICO

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos personales: Nacida en Monclova, Coahuila el 28 de Agosto de 1973, hija de Salvador Luna López y Sanjuana Elvia Aguirre.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Clínico Biólogo en 1996, segundo lugar en la generación.

