

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
Mycobacterium tuberculosis: PERFILES DE RESISTENCIA A ANTIFÍMICOS Y
MUTACIONES EN GENES ASOCIADOS A RESISTENCIA

POR:
M.C. SAMANTHA MARIBEL FLORES TREVIÑO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

MONTERREY, N.L.

NOVIEMBRE, 2013

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
Mycobacterium tuberculosis: PERFILES DE RESISTENCIA A ANTIFÍMICOS Y
MUTACIONES EN GENES ASOCIADOS A RESISTENCIA”

Aprobación de la Tesis:

Dr. C. Elvira Garza González
Director de Tesis

Dr. C. Gloria Ma. González González
Co-Director de Tesis

Dr. C. Virgilio Bocanegra García
Miembro de Comisión de Tesis

Dr. C. María del Rayo Camacho Corona
Miembro de Comisión de Tesis

Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna
Miembro de Comisión de Tesis

Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis*: PERFILES DE
RESISTENCIA A ANTIFÍMICOS Y MUTACIONES EN
GENES ASOCIADOS A RESISTENCIA”

Presentado por: M.C. Samantha Maribel Flores Treviño

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Micobacteriología y Microbiología Molecular, ambos del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina y en el Laboratorio Central del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dr. C. Elvira Garza González.

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres, a mis hermanos, y especialmente, a mi esposo.

Por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Elvira Garza González, asesora de mi tesis, por enseñarme mucho más que este proyecto y por su dedicación al guiarme por los caminos correctos de la ciencia; así como a los Doctores Gloria Ma. González González, Virgilio Bocanegra García, María del Rayo Camacho Corona y Roberto Montes de Oca Luna, por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

Al Centro de Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina y al Laboratorio Central del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Agradezco especialmente la ayuda y dedicación de Carlos Paz y Lucy Acevedo, ya que su presencia hizo este camino mucho más ameno.

A mis amigos y compañeros, Soraya, Perla, Néstor y Paola, por los buenos y malos momentos compartidos. Por enseñarme que esta trayectoria deja mucho más que crecimiento profesional. A mis amigos biólogos, por seguir siendo mis amigos a pesar de la distancia y el tiempo.

A mis padres y a mis hermanos, por el apoyo moral que siempre me ha brindado, por su paciencia y presencia, aún en la distancia.

A mi esposo, Humberto Salazar, por estar a mi lado, por su amor y por acompañarme en esta de muchas nuevas etapas. Por crecer junto a mí. Por todo lo que aún falta...

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Mycobacterium</i> spp.	1
1.1.1. Generalidades de <i>Mycobacterium</i> spp.	1
1.1.2. Clasificación de <i>Mycobacterium</i> spp.	2
1.1.3. Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
1.1.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
1.1.5. Identificación a nivel de especie	4
1.2. Aspectos generales de la tuberculosis	5
1.2.1. Epidemiología de la tuberculosis	6
1.2.2. Patogénesis de la tuberculosis	7
1.2.3. Manifestaciones clínicas de la tuberculosis	8
1.2.4. Terapia antifímica contra la tuberculosis	9
1.3. Farmacorresistencia de <i>M. tuberculosis</i>	11
1.3.1. Aspectos generales de farmacorresistencia	11
1.3.2. Desarrollo y transmisión de cepas farmacorresistentes	12
1.3.3. Clasificación de farmacorresistencia	13
1.3.4. Mecanismos moleculares de farmacorresistencia	14
1.3.4.1. Resistencia a inhibidores de la síntesis de pared celular	15
1.3.4.2. Resistencia a inhibidores de la síntesis de ácido nucleico	16
1.3.4.3. Resistencia a inhibidores de síntesis proteica	17
1.3.5. Pruebas de susceptibilidad a antifímicos	17
1.3.6. Farmacorresistencia en México	19
1.3.7. Mutaciones asociadas a resistencia en México	20
1.4. Epidemiología molecular de <i>M. tuberculosis</i>	21
1.4.1. Aplicaciones epidemiológicas	21
1.4.2. Métodos de genotipificación de <i>M. tuberculosis</i>	24
1.4.2.1. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción	24

1.4.2.2. Spoligotyping	25
1.4.2.3. Métodos de genotipificación alternos	26
1.4.3. Epidemiología molecular de <i>M. tuberculosis</i> en México	27
2. JUSTIFICACIÓN	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. General	31
3.2. Específicos	31
4. MATERIAL Y MÉTODOS	32
4.1. Estrategia general	33
4.2. Población de estudio	33
4.3. Procesamiento de las muestras clínicas	34
4.3.1. Descontaminación de Petroff	34
4.3.2. Tinción de Ziehl-Neelsen	34
4.3.3. Cultivo en Löwenstein-Jensen	35
4.4. Aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	35
4.5. Identificación de <i>M. tuberculosis</i>	35
4.5.1. Pruebas fenotípicas	36
4.5.1.1. Reducción del nitrato	36
4.5.1.2. Producción de la niacina	36
4.5.2. Pruebas genotípicas	37
4.5.2.1. Extracción de DNA por lisis enzimática	37
4.5.2.2. Amplificación de regiones de diferencia	38
4.6. Perfil de farmacorresistencia	39
4.6.1. Método de proporciones	39
4.6.2. Método de MGIT	40
4.7. Mutaciones en genes asociados a resistencia	40
4.7.1. Amplificación de genes asociados a resistencia	40
4.7.2. Digestión enzimática del gen <i>katG</i> (PCR-RFLP)	42
4.7.3. Pirosecuenciación de los genes <i>rpoB</i> , <i>inhA</i> y <i>ahpC</i>	42

4.7.4. Análisis estadístico	43
4.8. Genotipificación de <i>M. tuberculosis</i>	44
4.8.1. Spoligotyping	44
4.8.2. Análisis filogenético y genotipos predominantes	46
5. RESULTADOS	47
5.1. Aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	47
5.2. Perfil de farmacorresistencia fenotípico	48
5.3. Perfil de farmacorresistencia genotípico	50
5.4. Genotipos de <i>M. tuberculosis</i>	53
5.4.1. Spoligotipos de los aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	53
6. DISCUSIÓN	59
7. CONCLUSIONES	69
8. REFERENCIAS	70
9. ANEXOS	83
9.1. Anexo I. Preparación de reactivos y soluciones	83
9.2. Anexo II. Datos individuales de los aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> incluidos en este estudio	88
9.3. Anexo A. Pruebas primarias para la identificación de <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> y otras micobacterias	92

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Mecanismos de resistencia genotípica en <i>M. tuberculosis</i>	14
2. Iniciadores utilizados en la identificación de <i>M. tuberculosis</i>	39
3. Iniciadores utilizados en las PCR y secuenciaciones de genes asociados a resistencia	41
4. Características de las muestras e identificación de los aislamientos	48
5. Perfiles de farmacorresistencia de aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	50
6. Mutaciones en genes asociados a farmacorresistencia de aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	51
7. Perfiles de farmacorresistencia de aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	52
8. Descripción de aislamientos huérfanos encontrados en este estudio	54
9. Descripción de spoligotipos de aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	55
10. Patrones de farmacorresistencia en SIT encontrados en este estudio	57
11. SIT y linajes con mutaciones asociadas a farmacorresistencia encontrados en este estudio.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Dendograma de spoligotipos de aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	56

LISTA DE ABREVIACIONES

BAAR	Bacilo Ácido-Alcohol Resistente	PPD	Derivado proteico purificado
BCG	Bacilo Calmette-Guérin	PT	Prueba de la Tuberculina
CMI	Concentración mínima inhibitoria	PZA	Pirazinamida
CMT	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	QRDR	Región determinante de resistencia a quinolonas
DNA	Ácido desoxirribonucleico	RD	Regiones de diferencia
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato	RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
DR	Repetidos directos	RIF, R	Rifampicina
EMB, E	Etambutol	rpm	Revoluciones por minuto
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (latín: “y otros”)	RRDR	Región determinante de resistencia a rifampicina
FR	Farmacorresistencia	s	Segundos
g	Gramos	SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
h	Horas	SIT	Spoligotype International Type
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Air</i>	STR, S	Estreptomina
INH, I	Isoniazida	TB	Tuberculosis
K	Valor kappa	TBDReaMDB	TB Drug Resistance Mutation Database
L	Litros	TFR	Farmacorresistencia total
M	Concentración molar	U	Unidad
MFR	Multifarmacorresistencia	UFC	Unidades Formadoras de Colonia
mg	Miligramos	UV	Ultravioleta
MGIT	<i>Mycobacterial Growth Indicator Tube</i>	V	Voltios
min	Minutos	VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
MIRU	Unidades repetitivas intergénicas dispersas de micobacterias	VNTR	Número variable de repeticiones en tándem
mL	Mililitros	µg	Microgramos
mM	Concentración milimolar	µL	Microlitros
MNT	Micobacterias No Tuberculosas	µm	Micrómetros
ng	Nanogramos	XFR	Farmacorresistencia extendida
nm	Nanómetros		
nM	Concentración nanomolar		
OMS	Organización Mundial de la Salud		
pb	Pares de bases		
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		

RESUMEN

M.C. Samantha Maribel Flores Treviño Fecha de Graduación: Noviembre, 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título: “Caracterización genotípica de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*: perfiles de resistencia a antifímicos y mutaciones en genes asociados a resistencia.”

Número de páginas: 93

Candidato al Grado de Doctor en Ciencias con orientación en Microbiología Médica.

Área de estudio: Microbiología Médica.

Objetivos: Obtener el perfil de resistencia a antifímicos de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, detectar mutaciones asociadas, obtener spoligotipos y determinar su relación filogenética.

Material y Métodos: Se incluyeron 105 aislamientos identificados con pruebas fenotípicas y genotípicas. Se determinó su perfil de farmacorresistencia a isoniazida (INH), rifampicina (RIF), estreptomycin (STR) y etambutol (EMB) mediante el método de proporciones y el método de MGIT. Se analizaron los genes asociados a resistencia a INH (*katG*, *inhA* y *ahpC*) y RIF (*rpoB*), mediante PCR-RFLP y pirosecuenciación. Por último, se genotipificaron mediante spoligotyping.

Resultados: El 48.6% de los aislamientos fueron farmacorresistentes (FR), y 19% fueron multifarmacorresistentes (MFR). El 48% de los aislamientos resistentes presentó mutaciones en *rpoB*, el 14% en *katG*, el 26% en *inhA* y el 26% en *ahpC*. En aislamientos susceptibles a INH se encontró un posible polimorfismo en *ahpC* (29%). Se detectaron 31 spoligotipos distintos; 47 aislamientos se agruparon en 10 clústers (69%) y 21 aislamientos presentaron patrones únicos. Tres de estos patrones únicos correspondieron a patrones huérfanos en la base de datos, mientras que 1 tipo compartido (SIT) fue recientemente creado (n=2). Los linajes más prevalentes fueron: T (38.2%), Haarlem (17.7%) y Latinoamérica-Mediterráneo (17.7%), seguido de X (7.4%), S (5.9%), África-India del este (EAI, 1/68, 1.5%) y Beijing (1/68, 1.5%). Seis de los aislamientos agrupados fueron MFR (12.8%). SIT406 de la familia Beijing se detectó en un aislamiento MFR.

Conclusiones: Se detectaron altos niveles de FR y MFR. La baja frecuencia de mutaciones asociadas a farmacorresistencia junto con el nivel de agrupación indica que hay baja transmisión de clones de cepas MFR. Los linajes predominantes fueron T, Haarlem y Latinoamérica-Mediterráneo. Se detectó por primera vez en Latinoamérica un genotipo Beijing raro, SIT406, con un fenotipo MFR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Mycobacterium* spp.

1.1.1. Generalidades de *Mycobacterium* spp.

El género *Mycobacterium* es el único que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden *Actinomycetales*. Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos, inmóviles, de morfología bacilar, no forman esporas y no poseen flagelos ni cápsula. Poseen una pared celular gruesa y con un elevado contenido lipídico que consta de cuatro capas: la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico con cadenas cortas de alanina; la segunda capa posee arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos (ácidos grasos de cadena larga de gran importancia taxonómica) de la tercera capa. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como el factor cuerda y por mucósidos. En conjunto, esta composición de la pared le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular que en parte es responsable de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, así como de la característica ácido-alcohol resistencia con determinadas tinciones para su visualización microscópica. Las micobacterias poseen resistencia a los ácidos, álcalis, desecación y congelación. El calor, formaldehído, etanol (70%), glutaraldehído (2%) y peróxido de hidrógeno estabilizado son eficaces contra las micobacterias. Algunos componentes de la pared, como el lipoarabinomanano, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos (1).

1.1.2. Clasificación de *Mycobacterium* spp.

Dentro de *Mycobacterium* se han descrito más de 100 especies que pueden clasificarse de múltiples maneras. Según la velocidad de crecimiento, existen dos grupos clásicos: micobacterias de crecimiento lento y rápido según requieran más o menos de 7 días, respectivamente. Según la morfología y capacidad de pigmentación de las colonias en medios sólidos, se clasifican en no productoras de pigmento (no cromógenas) o productoras de pigmento en ausencia (escotocromógenas) o presencia de luz (fotocromógenas). De esta forma hay 4 grupos con cierta transcendencia clínica (2): Grupo I (fotocromógenas), Grupo II (escotocromógenas) y Grupo III (no cromógenas), de crecimiento lento y el Grupo IV, de crecimiento rápido.

Aunque esta clasificación tiene cierta utilidad microbiológica, en la actualidad, ante la incesante aparición de nuevas especies y las diferentes características fenotípicas que algunas de ellas pueden adoptar, se prefiere realizar una individualización al nivel de especie.

Con fines prácticos se establecen tres grupos en función de las entidades nosológicas producidas: a) el complejo *M. tuberculosis* que produce la enfermedad tuberculosis (TB) se encuentra formado actualmente por nueve especies; b) *M. leprae* que causa la lepra; y c) las micobacterias no tuberculosas (MNT), el resto de micobacterias distintas de las anteriores que provocan lo que se conoce como micobacteriosis. Estas micobacterias se caracterizan por menor patogenicidad que varía de especie a especie, pudiendo ser oportunistas o simplemente saprofitas (3).

1.1.3. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Las micobacterias que causan TB tanto en humanos como en animales se agrupan dentro del denominado Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). Actualmente, el CMT incluye varias especies cercanamente relacionadas, que poseen >95% de homología en su DNA: *M. tuberculosis* (agente principal de TB en humanos), *Mycobacterium bovis* (afecta a ganado bovino) (4), *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG, es una variante avirulenta obtenida en el laboratorio a partir de una cepa de *M. bovis* que por pases sucesivos perdió su patogenicidad y conservó su capacidad antigénica; actualmente se usa como vacuna para prevenir TB) (5), *Mycobacterium africanum* (afecta a humanos principalmente en África; subtipo I parecido a *M. bovis*, frecuente en el oeste de África y subtipo II parecido a *M. tuberculosis*, frecuente en el este de África) (6, 7), *Mycobacterium microti* (afecta a pequeños roedores) (8), *Mycobacterium canettii* (afecta también a humanos) (9), *Mycobacterium pinnipedii* (afecta a pinnípedos) (10), *Mycobacterium caprae* (afecta al ganado caprino) (11) y *Mycobacterium mungi* (afecta a mangostas) (12).

1.1.4. *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis es un bacilo delgado de extremidades redondeadas, con longitud de 2-5 μm y diámetro de 0.2 a 0.3 μm , es inmóvil, carece de cápsula o espora y no tiene ramificaciones. Se tiñe de color rojo con el método de Ziehl-Neelsen y una vez teñido es resistente a la decoloración con la mezcla de ácidos fuertes y alcohol, por lo que se le conoce como bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR).

En general las necesidades nutritivas de las micobacterias son sencillas; una fuente de carbono, preferentemente glicerol, y nitrógeno, como amonio o aminoácidos, así como determinadas sales minerales.

Por otro lado, el crecimiento de las micobacterias se ve estimulado por la presencia de CO₂ y ácidos grasos. La temperatura óptima de crecimiento es de 35-37°C (13). Las micobacterias tienen un crecimiento muy lento con un tiempo de multiplicación de 15 a 18 h en condiciones favorables y las colonias pueden no aparecer hasta por 4 a 6 semanas de incubación en medios de cultivo convencionales. Estas colonias son irregulares, rugosas y no pigmentadas (3).

M. tuberculosis tiene un genoma circular de 4,411,529 pares de bases (pb) y presenta un elevado contenido de G+C (61-71%) en su DNA (14).

1.1.5. Identificación a nivel de especie

Aunque *M. tuberculosis* es el bacilo tuberculoso más prevalente en los laboratorios clínicos, la identificación de otros miembros del CMT es de gran importancia epidemiológica. La identificación del CMT con pruebas bioquímicas o moleculares es relativamente sencilla, aunque la caracterización de especie suele requerir una mayor complejidad técnica.

En la actualidad, la identificación genotípica parece ser la mejor alternativa para una precisa y rápida identificación de las especies del CMT. Comúnmente se utiliza la amplificación de genes conservados específicos de especie mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estudios de genómica comparativa han revelado regiones de diferencia (RD) que representan la pérdida de material genético en *M. bovis* BCG comparado con *M. tuberculosis* H37Rv (cepa de referencia) (15). Algunos de estos

RD están restringidos a una o más especies del CMT y se han desarrollado sistemas basados en PCR para lograr un panel de identificación de las especies del CMT, en base a la presencia o ausencia de algunos de los RD (16, 17).

1.2. Aspectos generales de la tuberculosis

La TB es una de las enfermedades reemergentes de mayor mortalidad. Del latín *tuberculum*, que significa pequeña protuberancia o nódulo, es una enfermedad infecciosa causada por un grupo de bacterias del orden *Actinomycetales* de la familia *Mycobacteriaceae*, principalmente por *M. tuberculosis* (1).

La reemergencia de la TB fue impulsada en parte por las deficiencias inmunes de personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), que incrementaron el riesgo de que la infección latente del bacilo tuberculoso progrese a enfermedad activa y sea transmitida a otros.

El uso inadecuado de la terapia antifélica complica el problema, que conduce a la aparición y propagación de cepas farmacorresistentes y una necesidad de implementación de estrategias de tratamiento más costosas (18).

En el diagnóstico de la enfermedad la microbiología es fundamental ya que, además de la posible detección microscópica de los bacilos en la muestra, el aislamiento del agente causal en el cultivo y su posterior identificación sigue siendo la clave del diagnóstico definitivo de la TB. Además, se pueden realizar pruebas de susceptibilidad a los antifélicos y posibles estudios moleculares para su vigilancia epidemiológica (13).

1.2.1. Epidemiología de la tuberculosis

A pesar de la disponibilidad de un tratamiento altamente eficaz, la TB sigue siendo un importante problema mundial. En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró esta enfermedad como una emergencia de salud pública global. En 2010, se estimaron 8.5-9.2 millones de casos y 1.2-1.5 millones de muertes a causa de la TB.

Actualmente, la TB es la segunda causa de muerte por una infección a nivel mundial; se calcula que alrededor de un tercio de la población mundial está infectada por el bacilo tuberculoso y que cada segundo se infecta una persona más (19).

De acuerdo con la información disponible en el componente de Tuberculosis del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en México se registran cada año cerca de 15 mil casos nuevos de TB pulmonar y cerca de dos mil defunciones por esta causa, lo que representa una importante pérdida de años potenciales de vida saludable y, por consiguiente, un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de México. En 2010 se reportó un total de 18,848 casos nuevos de TB en todo el país, correspondiendo a una tasa de incidencia de 16.8 casos por cada 100 mil habitantes y 13.0 casos específicamente en el estado de Jalisco.

Una complicación creciente del manejo inadecuado de antifímicos es la multifarmacorresistencia. En el año 2010 se presentaron en México 140 casos nuevos en 23 estados notificantes. Nueve estados no notificaron este problema, entre los cuales se encuentra Jalisco. La prevalencia a nivel nacional fue de 297 casos.

La comorbilidad de la TB con otras entidades patológicas es frecuente: en 2010 se registró un total de 1,189 casos nuevos coinfectados con VIH; a nivel nacional reflejaron una tasa de incidencia de 1.1 casos por cada 100 mil habitantes. Once entidades federativas sobrepasaron la tasa nacional, entre ellos Jalisco con 1.3 casos (20).

1.2.2. Patogénesis de la tuberculosis

La infección con *M. tuberculosis* ocurre mediante transmisión por aerosoles de microgotas que contienen algunos bacilos viables y virulentos producidos por un individuo infectado. Los bacilos se depositan en los espacios alveolares de los pulmones, donde son fagocitados por macrófagos alveolares (21, 22). Las células T son atraídas al sitio de la infección primaria que contiene los bacilos. Para evitar confrontación directa con las defensas del sistema inmune del hospedero, *M. tuberculosis* retarda su tasa de replicación y se inactiva, disminuyendo su actividad metabólica. El sistema inmune no es capaz de eliminar la bacteria y ésta permanece inactiva hasta que el balance entre la persistencia bacteriana y la respuesta inmune se perturba.

Una mala respuesta inmune por parte del hospedero se puede deber a varias razones como edad avanzada, desnutrición, el uso de esteroides o infección con VIH, permitiendo la reactivación de los bacilos resultando en la manifestación clínica de la TB (23).

El porcentaje de individuos que se infectan varía, principalmente dependiendo de las condiciones ambientales, la frecuencia de exposición y la concentración de las bacterias en el aire, pero generalmente es considerado muy bajo. En contacto con un caso infeccioso, aproximadamente 1 de 6 personas resultará infectada (24).

Aproximadamente un tercio de la población mundial (2 mil millones de personas) se encuentran infectadas de forma latente con *M. tuberculosis* y no presentan ningún síntoma clínico. De los individuos infectados, más del 90% exitosamente controlan la infección debido a una respuesta inmune eficiente.

1.2.3. Manifestaciones clínicas de la tuberculosis

Los síntomas de la TB se desarrollan sólo en una pequeña población de las personas infectadas. Estos pacientes usualmente desarrollan una afectación pulmonar; los síntomas más prominentes son tos crónica y productiva, fiebre, sudoración nocturna, fatiga y pérdida de peso (25). Las lesiones pulmonares tempranas por lo general se curan sin dejar alteraciones residuales, salvo calcificaciones ocasionales en los pulmones o en los ganglios linfáticos traqueobronquiales. Cerca de 10% de los individuos que contraen la infección a la larga presentan la enfermedad activa, la mitad de ellos durante los dos primeros años después de infectarse; el 90% de los individuos infectados no tratados jamás padecerán la enfermedad activa. El seguimiento de un tratamiento completo y adecuado para la infección tuberculosa latente puede reducir considerablemente el riesgo de presentar TB clínica, y es eficaz en las personas infectadas por el VIH (18).

En algunas personas, la infección inicial puede evolucionar rápidamente hasta convertirse en TB activa. Esto es más común en los lactantes, en quienes la enfermedad con frecuencia adopta la forma diseminada (TB miliar) o meníngea (del sistema nervioso) y en los individuos inmunodeprimidos, como los infectados por VIH (26). Se considera que un enfermo de TB pulmonar que no recibe tratamiento puede infectar de 10 a 15 personas en el transcurso de un solo año y 5 a 10% de los infectados pueden desarrollar la enfermedad en algún momento de su vida (20).

El bacilo tuberculoso puede diseminarse a cualquier parte del organismo desde las primeras fases, por ello, la TB puede afectar cualquier órgano o tejido, aunque la localización más frecuente es la pulmonar que es la vía de entrada del bacilo y representa 80-85% de los casos (25). La TB pulmonar puede ser consecuencia de una reinfección exógena o de la reactivación endógena de un foco latente que persistió desde

la infección subclínica inicial. Aproximadamente 65% de los enfermos de TB pulmonar con frotis positivo (casos bacilíferos) no tratados mueren en 5 años, la mayoría de ellos en el curso de los dos primeros.

La TB extrapulmonar es menos común que la pulmonar. Los niños y las personas con inmunodeficiencias (VIH), tienen un mayor riesgo de TB extrapulmonar, pero la forma pulmonar sigue siendo el tipo más frecuente en todo el mundo. La enfermedad puede afectar a cualquier órgano o tejido: la pleura, el pericardio, los riñones, los huesos y articulaciones, la laringe, el oído medio, la piel, los intestinos, el peritoneo y los ojos, el sistema nervioso central (meníngea) y los ganglios linfáticos (miliar); siendo las dos últimas las presentaciones de mayor gravedad (23).

La detección de la población infectada se puede realizar mediante la prueba de la tuberculina (PT). Esta sustancia es un derivado proteico purificado (PPD) obtenido de un filtrado de un cultivo de *M. tuberculosis* esterilizado y concentrado. Esta prueba se basa en la hipersensibilidad que pueden tener las personas que han estado en contacto previo con el bacilo tuberculoso o que han sido vacunadas con el BCG (5).

1.2.4. Terapia antifímica contra la tuberculosis

La etapa antibiótica de la TB se inició en 1944 con la estreptomina (STR). Poco después se introdujeron la isoniazida (INH) y el ácido para-amino-salicílico (PAS), todos en monoterapia. Pronto se observó que después de unas semanas de mejoría clínica, la enfermedad continuaba su curso. Se atribuyó a la selección de las bacterias resistentes, después de la eliminación inicial de las sensibles. La primera pauta combinada se utilizó en 1958. Pocos años después, con la introducción de rifampicina

(RIF), etambutol (EMB) y más tarde pirazinamida (PZA), comenzaron los tratamientos eficaces.

El objetivo del tratamiento es erradicar los bacilos en el hospedero y prevenir la emergencia de cepas resistentes. En el tratamiento contra la TB se utilizan los fármacos de primera y segunda línea. Los de primera línea incluyen INH, RIF, EMB, STR y PZA. Los fármacos de segunda línea son etionamida, cicloserina, fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina), kanamicina, amikacina y capreomicina.

Cada uno de los antifímicos varía en su capacidad de eliminar bacterias y de prevenir el desarrollo de farmacorresistencia (18, 27). Las poblaciones bacterianas existentes en las lesiones tuberculosas se definen de la siguiente forma: una primera población, extracelular, activa y creciendo a pH neutro, que es la mayoritaria y frente a la cual INH es el fármaco más activo. Una segunda población formada por bacilos intracelulares, menos activos y en ambiente ácido, donde PZA es el fármaco más útil. Una tercera población, de bacilos latentes poco activos, en el interior de las lesiones caseosas, donde RIF es el fármaco más efectivo. Por último, una población minoritaria, formada por bacilos inactivos durante períodos prolongados, en el curso de los cuales no son susceptibles a los fármacos. Las dos últimas poblaciones están implicadas en las reactivaciones, y justifican la larga duración del tratamiento (28, 29).

Las pautas actuales incluyen 3-4 fármacos en una primera fase de ataque en la que se eliminan la mayoría de las bacterias de las lesiones y una segunda fase con dos fármacos, eficaz frente a la población latente, menos activa metabólicamente. Mundialmente, se recomienda un régimen de tratamiento de 2 meses con INH, RIF, EMB y PZA diariamente, seguido de 4 meses de INH, RIF diariamente (18), el cual ha

resultado muy exitoso, obteniendo BAAR negativo en 90% de las personas afectadas con TB a los 2 meses.

1.3. Farmacorresistencia de *M. tuberculosis*

1.3.1. Aspectos generales de la farmacorresistencia

La historia de la TB ha cambiado drásticamente después de la introducción de los primeros fármacos con actividad antimicobacteriana. Lo que anteriormente se había considerado como una enfermedad que debía tratarse en el sanatorio se convirtió en una enfermedad que podía ser tratada con antibióticos. Sin embargo, no mucho después de que el primer antibiótico fuera administrado en 1944, emergió la farmacorresistencia principalmente debido al uso de estreptomina como monoterapia (30). Con el descubrimiento de otros distintos fármacos con actividad anti-tuberculosa, la terapia con fármacos múltiples se hizo fundamental para el control de la enfermedad al promover la cura de los pacientes y así interrumpir la cadena de transmisión.

La farmacorresistencia (FR) se define como la capacidad temporal o permanente de los microorganismos y su progenia de permanecer viables o multiplicarse en presencia de una concentración del fármaco que normalmente destruiría o inhibiría el crecimiento celular. Se considera que una cepa es resistente cuando el 1% del inóculo de la población bacteriana en estudio es resistente a una concentración prefijada de un determinado fármaco (31, 32).

La emergencia de cepas de *M. tuberculosis* FR se ha convertido en un problema mundial. Desde principios de 1990 se han reportado brotes de *M. tuberculosis* FR en Estados Unidos, principalmente en la ciudad de Nueva York (33) y posteriormente en el

resto del mundo. Por lo tanto, en 1994 se inició un Proyecto Global en Vigilancia de Farmacorresistencia a Antifímicos (19).

1.3.2. Desarrollo y transmisión de cepas farmacorresistentes

En el caso de *M. tuberculosis*, el desarrollo de FR no ocurre mediante adquisición de nuevos genes de resistencia como se ha descrito para otras bacterias mediante transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (34), sino que es el resultado de mutaciones genéticas espontáneas en genes particulares que confieren resistencia, independientemente de la exposición a fármacos (31). La proporción de bacilos resistentes varía para diferentes antifímicos, por ejemplo, la incidencia probable de mutantes resistentes a RIF es aproximadamente 1 en 10^8 bacilos, y la incidencia probable de mutantes resistentes a INH, STR, EMB es de aproximadamente 1 en 10^6 bacilos (35).

La selección de bacilos resistentes puede suceder cuando un gran número de ellos están presentes en un paciente tratado con terapia antifímica incorrecta, ya sea falta de adherencia por parte del paciente o una terapia interrumpida (36, 37).

Desde el punto de vista del paciente, tener una cepa resistente implica mayor gravedad de su enfermedad, con cambios en el tratamiento, tanto en el número y tipo de fármacos como en el período durante el que se deben administrar. Por otra parte, la garantía de curación es menor y la posibilidad de efectos adversos y de secuelas funcionales aumenta.

Con un enfoque epidemiológico es importante cuantificar la resistencia y, sobre todo, su origen. El desarrollo de resistencia durante la terapia se le conoce como “FR en pacientes previamente tratados”, anteriormente conocido como resistencia secundaria o

adquirida. Esta resistencia se debe a deficiencias corregibles en el control de la enfermedad en un área determinada. En cambio, la FR en pacientes que nunca han recibido tratamiento antifímico, se define como “FR en nuevos casos”, anteriormente conocida como resistencia primaria. Esta resistencia se debe a mutaciones espontáneas en el mismo paciente o al contagio a partir de cepas resistentes (23).

Aunque la FR se ha asociado con pacientes inmunosuprimidos (38), también se ha demostrado la transmisión de cepas resistentes en el resto de la población inmunocompetente (39) e incluso en pacientes con terapia antifímica regular (40). Es decir, la transmisión de cepas resistentes también contribuye a la emergencia de cepas FR.

1.3.3. Clasificación de farmacorresistencia

La farmacorresistencia de la tuberculosis se clasifica según las siguientes cuatro definiciones (41): Monorresistencia: resistencia a un antifímico de primera línea; Polirresistencia: resistencia a más de un antifímico de primera línea, distinto de INH y RIF. Puede incluir a uno de los dos, pero nunca los dos simultáneamente; Multifarmacorresistencia (MFR): resistencia a INH y RIF simultáneamente; Farmacorresistencia extendida (XFR): resistencia a INH, RIF, por lo menos una fluoroquinolona (ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina o moxifloxacina) y un aminoglucósido (kanamicina, amikacina, capreomicina).

El desarrollo de FR múltiple resulta por periodos repetidos de monoterapias secuenciales donde se puede adquirir resistencia a otros antifímicos. La MFR se ha asociado con altos índices de mortalidad (50% a 80%) y lapsos de tiempo relativamente cortos (4 a 16 semanas) desde el diagnóstico hasta la muerte (42). El reconocimiento

retrasado de FR, que resulta en un retraso en la aplicación de la terapia efectiva, es uno de los principales factores que contribuyen a brotes de MFR. En la mayoría de los países, la MFR ha aumentado en incidencia e interfiere con los programas de control de TB, particularmente en países en desarrollo, donde el índice de prevalencia es tan alto como 48% (43, 44). Casi 500 mil casos de MFR emergen cada año a nivel mundial y entre 5%-7% de éstos se convierten en XFR (19). Últimamente incluso se ha reportado la aparición de cepas resistentes a todos los antifímicos, los llamados “totalmente farmacorresistentes”, panresistentes o TFR (43).

1.3.4. Mecanismos moleculares de farmacorresistencia

Avances recientes en la dilucidación de mecanismos moleculares de la FR lograron la identificación de aproximadamente 12 genes involucrados en resistencia en *M. tuberculosis* (Tabla 1) (31, 45-47).

TABLA 1. Mecanismos de resistencia genotípica en *M. tuberculosis*

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

1.3.4.1. Resistencia a inhibidores de la síntesis de pared celular

La INH es uno de los antifímicos más potentes y se usa junto con RIF en casi todos los regímenes terapéuticos anti-tuberculosos (18). La INH tiene una estructura simple con un anillo de piridina y un grupo hidrazida; ambos componentes son esenciales para la elevada actividad contra *M. tuberculosis*. La resistencia a INH es un proceso complejo. Las mutaciones en los genes *katG* (48), *inhA* (49), *ahpC* (50), *kasA* (51) y *ndh* (52) se han asociado con resistencia a INH en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.

La INH es un pro-fármaco que requiere activación mediada por la enzima catalasa-peroxidasa codificada por el gen *katG* (48). La INH activada interfiere con la síntesis de ácidos micólicos esenciales al inhibir la enzima enoil-acil reductasa, la cual es codificada por el gen *inhA* (49). Dos mecanismos moleculares han probado ser la principal causa de resistencia a INH: mutaciones en *katG* y en *inhA*, más frecuentemente en su región promotora (53, 54).

La disminución o pérdida total de la actividad de la catalasa/peroxidasa, resultado de mutaciones en *katG*, es la alteración genética más asociada con resistencia a INH (48). Específicamente, la mutación más común es en el codón 315 de *katG*, un cambio de serina a treonina, que resulta en un producto de INH que es altamente deficiente (55). En *inhA*, la mutación más común ocurre en la región promotora, en la posición -15, una sustitución de citosina a timina (56).

En *M. tuberculosis*, el gen *ahpC* codifica para una alquil hidropoxidasa que se encuentra implicada en la resistencia a oxígeno reactivo e intermediarios de nitrógeno reactivo. Las mutaciones asociadas a resistencia a INH más comunes se presentan en la región intergénica *oxyR-ahpC* (50). No obstante, se ha encontrado que un incremento en

la expresión de *ahpC* parece ser una mutación compensatoria por la pérdida de la actividad catalasa/peroxidasa en lugar de ser realmente la base de resistencia a INH (45, 57).

La prevalencia de mutaciones particulares que confieren resistencia ha sido analizada en varios estudios. En aproximadamente el 50% de los aislamientos resistentes, se determinaron mutaciones en el gen *katG* (58, 59), el 20-30% de los aislamientos resistentes tenían mutaciones en *inhA* (50, 58, 59) y en el 10-15% se encontraron mutaciones en *ahpC* (59, 60).

Por otro lado, el EMB también pertenece a los fármacos de primera línea usados como anti-tuberculosos. Hasta el 65% de aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes al EMB han presentado mutaciones en el clúster de genes *embCAB* (61). Las mutaciones más comunes son sustituciones en el aminoácido 306 del gen *embB*, las cuales han sido asociadas con alto nivel de resistencia (62, 63), aunque también se encontraron en aislamientos susceptibles a EMB (64) con fenotipo MFR (65). Inicialmente se le asoció con resistencia general y no con resistencia a EMB, pero posteriormente se corroboró su asociación a resistencia a EMB (66). Se concluyó que las mutaciones en *embB306* encontradas en aislamientos susceptibles fueron debido a problemas con las pruebas de susceptibilidad a EMB.

1.3.4.2. Resistencia a inhibidores de la síntesis de ácido nucleico

La RIF es un compuesto crítico usado en el régimen corto en la terapia anti-tuberculosa (18). El blanco de RIF en *M. tuberculosis* es la subunidad β de la RNA polimerasa, donde se une e inhibe la elongación del RNA mensajero (67). A diferencia de la INH, donde varios genes de resistencia se encuentran involucrados, la resistencia a

RIF se basa principalmente en mutaciones puntuales en una pequeña región de 81 pb, que abarca los codones 507 a 533 del gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa, conocida como región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR). Estas mutaciones se presentan en aproximadamente 95% de los aislamientos resistentes. Las mutaciones más frecuentes son cambios en los codones 531, 526 y 516 (68, 69). Algunos estudios también han reportado mutaciones fuera de la RRDR en aislamientos resistentes a RIF (70).

1.3.4.3. Resistencia a inhibidores de la síntesis proteica

La STR es un antibiótico que ha sido usado para el tratamiento contra la TB desde 1944. Se han identificado mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs* en 50% y 20% de los aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a la STR, respectivamente, confiriendo intermedios o altos niveles de resistencia (71).

1.3.5. Pruebas de susceptibilidad a antifímicos

Los métodos fenotípicos se basan en la realización del estudio de sensibilidad frente a los fármacos utilizados en el tratamiento. Actualmente se realizan tres métodos: a) la proporción de resistencia, descrito por Mitchison (13), que compara la CIM (concentración inhibitoria mínima) de una determinada cepa con la de una cepa de referencia; b) las concentraciones absolutas, descrito por Meisser, que compara el número de colonias en presencia del fármaco, con el número de colonias en medio de cultivo sin el fármaco; y c) las proporciones críticas, descrito por Canetti y Grosset (72), en que se comparan las colonias crecidas en diferentes diluciones con las presentes en medio sin antibiótico, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias

capaces de crecer en presencia del fármaco; este último es mucho más ampliamente utilizado.

En el método de proporciones, para la mayoría de los antifímicos, la resistencia a *M. tuberculosis* se define como la presencia de organismos resistentes en >1% de una población dada de bacilos tuberculosos.

La terapia será exitosa sólo si la proporción crítica de organismos y la concentración crítica del antifímico (la concentración en la cual inhibe la cepa silvestre pero no la cepa mutante) son estrictamente definidas y por lo tanto, se define la cepa que es completamente susceptible a los antifímicos de primera línea *in vitro*.

Otro método fenotípico es el MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*), el cual es un medio fluorométrico basado en el medio Middelbrook 7H9 con un componente fluorescente (pentahidrato de rutenio) embebido en silicona. Bajo la luz ultravioleta, el crecimiento se aprecia mediante la visualización de un brillo fluorescente anaranjado en la superficie y en el fondo del tubo como consecuencia de una depleción de O₂. Es un medio sencillo que permite la lectura manual simultánea de diversos cultivos con una fuente de luz ultravioleta. Al añadirle al tubo un antifímico con una concentración establecida, junto con un inóculo determinado, y luego al comparar con un tubo control sin antifímico, se puede determinar la susceptibilidad de una cepa específicamente.

Los métodos genotípicos se basan en la detección de las alteraciones genéticas que condicionan resistencia a los diferentes fármacos. Potencialmente pueden detectarse estas alteraciones con gran rapidez, incluso directamente en las muestras clínicas. Sin embargo, su principal inconveniente es que, con excepción de RIF, no se conocen las

alteraciones genéticas que causan entre el 20 y el 40% de las resistencias a la mayoría de los fármacos de primera línea (73).

1.3.6. Farmacorresistencia en México

Los primeros reportes de FR de TB en México respecto a aislamientos clínicos se realizaron en el Distrito Federal en 1976 (74) y luego en 1982 (75). Desde entonces, se han reportado diferentes niveles de FR y MFR en varios estados como son Baja California (76-80), Chiapas (79, 81), Chihuahua (82, 83), Coahuila (84), Colima (79), Distrito Federal (74, 75, 85), Estado de México (79, 86-88), Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco (79, 89), Nayarit (79), Nuevo León (90-93), Oaxaca (77, 79), Puebla, Querétaro (79), San Luis Potosí (94), Sinaloa (77, 79, 95), Sonora (96), Tabasco (79), Tamaulipas (79, 83, 97), Veracruz (98-102) y Yucatán (79).

En una revisión que se publicó en 2009 se mostró la variabilidad en las proporciones de FR y MFR en diferentes áreas geográficas del país, basada en varios estudios relacionados publicados a la fecha. El promedio de FR y MFR fue de 33% y 17%, respectivamente (103).

Hasta la fecha, los estados más estudiados son Veracruz (98-102), Distrito Federal y el Estado de México (79, 86-88), seguidos de Nuevo León (90-92). Los niveles de resistencia de Veracruz han sido constantes en el periodo 2000-2004, con un promedio de 24.5% (98-102), aunque el nivel de MFR ha ido disminuyendo casi a la mitad de 10.8% (98) a 5.7% (101). Por otro lado, en el Distrito Federal y Estado de México los niveles de resistencia han incrementando del año 1995 al 2001: FR de 30% a 68.3% y MFR de 19% a 30% (86-87). De igual forma en Nuevo León del año 2001 al 2010: FR de 32% a 52.2% y MFR de 18% a 33.3% (90-92).

Los estados con niveles de FR más altos son el Distrito Federal y el Estado de México (78.9%) (87), Chiapas (72.2%) (81) y Nuevo León (53.5%) (91) y los índices de MFR fueron más altos en Chiapas (53%) (81), Jalisco (38%) (89) y Distrito Federal y el Estado de México (35.3%) (87).

1.3.7. Mutaciones asociadas a resistencia en México

En México, pocos estudios han analizado la frecuencia de mutaciones asociadas a FR en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, en los cuales se han incluido el Distrito Federal (65, 85, 104-107), Durango (106), Nuevo León (97, 108, 109), Puebla (65, 104, 105), Sonora (110), Tamaulipas (97) y Veracruz (65, 104, 105, 111, 112).

Las mutaciones reportadas en el gen *rpoB* asociadas a resistencia a RIF, han sido en los codones 509, 510 (111), 511 (104, 106), 513 (107), 516 (97, 107-109, 111), 522 (92, 107, 109), 524 (111), 526 (92, 97, 106-111), 528 (111), 530 (104), 531 (85, 92, 97, 104, 106-111) y 533 (97, 104, 107, 109), todos estos, dentro de la región RRDR, aunque también se han reportado mutaciones fuera de esta región, en los codones 469 (85), 561 (109), 572 (104, 107). Las mutaciones más frecuentes son *rpoB531*, *rpoB526* y *rpoB516*.

Las mutaciones asociadas a resistencia a INH reportadas en el país del gen *katG* están en las posiciones 29-353 (delección), 249 (109), 271 (92), 275, 307 (109), 311 (111), 315 (85, 92, 108-111), 318, 328, 331 (111), 727 (109), siendo la posición 315 el lugar de mutaciones más frecuente. De igual forma, se han reportado mutaciones asociadas a esta misma resistencia en los genes *inhA* en la posición de la región promotora -15 (97, 109, 110) y *ahpC* en las posiciones -39, -32, -10 (97, 110).

Además se han reportado mutaciones asociadas a resistencia a EMB en las posiciones 306 (65, 109) y 406 (109) del gen *embB*, y a STR en las posiciones 189, 426

(109), 483, 485 (112), 491 (109), 496, 513 (112), 516 (109), 795, 870, 907 (112) y 1238 (109) del gen *rrs* y 43 (109) y 88 (112) del gen *rpsL*.

Aunque numerosas mutaciones que no habían sido reportadas previamente se identificaron en varios estudios realizados en México, algunas de estas mutaciones (85, 104, 107) no aparecen en la base de datos de mutaciones asociadas a resistencia en TB (*TB Drug Resistance Mutation Database*, TBDReaMDB). Esta base de datos muestra una lista de mutaciones potenciales ya establecidas asociadas con FR en TB, al igual que la frecuencia relativa y la distribución geográfica de las mutaciones más comunes. Actualmente es la base de datos de acceso libre más grande (113).

1.4. Epidemiología molecular de *M. tuberculosis*

La genotipificación o caracterización molecular de cepas de una misma especie permite conocer los aislamientos procedentes de individuos y relacionarlos con otros para determinar las cadenas de transmisión de la enfermedad.

En los últimos años, la tipificación molecular de aislamientos de *M. tuberculosis* ha demostrado ser la herramienta diagnóstica más importante en el manejo de la TB. Se ha aplicado al estudio de casos concretos en la investigación de brotes, así como a una población general y a grupos específicos, permitiendo obtener una amplia información sobre la transmisión de la enfermedad y sus factores de riesgo, así como de la capacidad de contagio de las cepas resistentes (114).

1.4.1. Aplicaciones epidemiológicas

Contaminación cruzada. La contaminación cruzada en el laboratorio puede ocurrir debido a la alta viabilidad de las micobacterias a pesar de las no tan óptimas

condiciones ambientales (115, 116) y la complejidad del procesamiento de las muestras. Esta contaminación cruzada puede resultar en un diagnóstico incorrecto y consecuentemente, un tratamiento de largo plazo innecesario (117). Las técnicas de tipificación molecular han permitido reconocer que ha ocurrido contaminación cruzada en el laboratorio más frecuentemente de lo que se sospechaba (118).

Transmisión de TB. Las técnicas de tipificación molecular permiten determinar si una cepa causante de enfermedad en un caso es idéntica a la que causa enfermedad en otro caso, y así determinar si es que pudo haber ocurrido transmisión. Así se puede calcular la proporción de todos los casos en una población que comparten aislamientos idénticos, es decir, que están agrupados o pertenecen a un clúster. Se han encontrado altos niveles (30-40%) de agrupación en algunos lugares de baja incidencia de TB (119), sugiriendo que la proporción de la enfermedad atribuible a una transmisión reciente es mucho más alta que lo que anteriormente se pensaba.

Lo anterior tiene implicaciones importantes para el control de la TB: es más fácil controlar la TB al interrumpir la transmisión si la mayor parte de la morbilidad es atribuible a transmisión reciente que si es atribuible a reactivación de una infección adquirida hace muchos años (120). Sin embargo, varios factores influyen el grado de agrupación en una población, por ejemplo, el grado de agrupación aumenta con la fracción de casos incluidos y la duración del estudio (119).

Reactivación o Reinfección. Antes se consideraba que en los países con baja incidencia de la TB la mayoría de enfermos correspondían a reactivación endógena de infecciones del pasado. La tipificación sistemática de amplias poblaciones ha evidenciado que las infecciones recientes son causa de un número considerable de casos en estos países, oscilando de una sexta parte hasta casi la mitad. Asimismo, en países de

elevada incidencia se observa, además de una proporción importante de infecciones recientes (120), un número limitado de cepas circulantes responsables de gran parte de los casos, que indicaría una tasa elevada de infección reciente y/o el predominio de determinadas cepas, basado en una mejor capacidad de adaptación o una mayor virulencia. Este hallazgo respecto a la proporción de infección reciente en países de baja incidencia, indicaría la necesidad de adecuar mejor las estrategias de los programas de control a la búsqueda de casos nuevos.

Por otra parte, la tipificación también ha aclarado dudas respecto al papel que pudiera jugar la infección exógena en pacientes que sufren un segundo episodio de tuberculosis. Así, diversos estudios han demostrado que entre el 12 y el 60% de recidivas de la enfermedad se deben realmente a nuevas reinfecciones (119).

Nivel de relación genética en distintas áreas geográficas. La tipificación de cepas en distintas áreas geográficas ha revelado que la estructura de la población de *M. tuberculosis* difiere significativamente entre lugares con baja y alta incidencia de TB. Por ejemplo, se ha mostrado un alto polimorfismo en áreas con baja incidencia de TB (119).

Esto ha llevado a una investigación extensiva en las ventajas selectivas de genotipos predominantes, tal es el caso del genotipo Beijing de *M. tuberculosis*, el cual es altamente prevalente en Asia (121).

Transmisión de cepas farmacorresistentes. La tipificación también ha aportado información muy valiosa en la identificación y rastreo de brotes de cepas MFR. Durante años se pensó que las cepas resistentes no se transmitían, o muy poco, basándose en la escasa proporción de casos secundarios en el entorno de pacientes con TB resistente.

Actualmente, las técnicas de tipificación molecular han ayudado en la identificación y rastreo de brotes de MFR-TB (122). La detección rápida de estos brotes, especialmente si se encuentran involucrados individuos infectados con VIH, es importante, dado el intervalo de tiempo potencialmente corto entre la infección y la enfermedad (en algunos casos muerte) entre individuos infectados con VIH. A pesar de los grandes brotes, aún no está claro si las cepas farmacorresistentes son tan transmisibles como las cepas susceptibles.

1.4.2. Métodos de genotipificación de *M. tuberculosis*

Los requisitos ideales que debería reunir un método de tipificación serían: elevado grado de discriminación, metodología sencilla y rápida, económicamente accesible, resultados reproducibles, aplicabilidad directa sobre muestras clínicas y utilidad para discriminar los restantes componentes del complejo *M. tuberculosis*.

1.4.2.1. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de la secuencia de inserción 6110 (RFLP-IS6110), es la técnica de tipificación más conocida y utilizada; es considerada como el estándar de oro para genotipificación del CMT (119, 123-126). Se basa en la detección de la secuencia repetitiva IS6110, que puede encontrarse en la mayoría de los aislamientos del CMT. El polimorfismo se presenta en el diferente número de copias de la secuencia de inserción IS6110 que presentan las distintas cepas y en su posición en el genoma (127-129).

Sin embargo, a pesar de ser todavía la técnica más ampliamente recomendada, el RFLP-IS6110 presenta algunas limitaciones que impulsan la búsqueda de nuevos

métodos. Requiere de una elevada cantidad de bacterias para obtener el DNA necesario; la técnica es excesivamente larga y compleja; permite el análisis simultáneo de pocas cepas; existen puntos sensibles en el protocolo que pueden afectar la calidad del resultado y el costo económico del programa de apoyo informático es elevado (130). Por otra parte, es pobremente discriminante cuando se obtienen menos de 6 copias del IS6110 en los patrones genotípicos (124).

1.4.2.2. Spoligotyping

Entre las técnicas alternativas al RFLP-IS6110, el *spoligotyping* (tipificación de oligonucleótidos espaciadores) permite visualizar con mayor claridad las cepas no idénticas que forman parte de una familia; se usa habitualmente cuando se observan menos de 5 copias con el RFLP-IS6110. Esta técnica se basa en la detección de polimorfismos de DNA en el locus de repetidos directos (DR) del genoma del CMT (131). Esta región genómica contiene secuencias repetitivas de 36 pb, entre las cuales hay secuencias espaciadoras de 31 a 41 pb que son de composición y longitud variable en diferentes cepas; la presencia de estas secuencias espaciadoras difiere entre las distintas cepas.

Para visualizar el polimorfismo en la región DR de *M. tuberculosis*, la región DR es amplificada por PCR usando iniciadores basados en la secuencia DR. El iniciador reverso está etiquetado con biotina, y por lo tanto, también el producto. Tomando como referencia las secuencias espaciadoras de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y de la cepa P3 de *M. bovis* BCG, se diseñaron 43 sondas. Estas sondas se alinean y se unen covalentemente a una membrana en líneas paralelas. Los productos de PCR de la región DR de las cepas a estudiar son biotinilados e hibridados a las sondas unidas a la

membrana. La hibridación posteriormente se detecta al añadir un conjugado de estreptavidina-peroxidasa y un sustrato, que resulta en una reacción quimioluminiscente que se detecta en una película.

Un patrón de reconocimiento específico de los espaciadores es llamado spoligotipo. Los spoligotipos evolucionan a través de la pérdida de secuencias espaciadoras, que, una vez perdidas, no son recuperadas, de forma que la evolución es unidireccional (132). Por lo tanto, la identificación de los spoligotipos permite estudiar la diversidad genética y la distribución filogeográfica de los aislamientos (133).

Es una técnica sencilla, accesible, rápida y reproducible (131, 134). La lectura se realiza como un código digital y puede usarse como método de tamizado, ya que cuando el patrón es distinto, el RFLP también lo es y permite hacer múltiples tipificaciones en poco tiempo.

Los spoligotipos en código octal se ingresan en la base de datos internacional SITVITWEB del Instituto Pasteur de Guadalupe (135), un número SIT (*Spoligotype International Type*) se asigna a un patrón compartido por dos o más aislamientos, y a los patrones de un solo aislamiento se les denomina “huérfanos”. En la base SITVITWEB, hay información disponible de 62,582 aislamientos clínicos correspondientes a 153 países de origen del paciente (105 países de origen de aislamiento). Se han reportado 7,105 patrones de spoligotipos (correspondientes a 58,180 aislamientos clínicos) agrupados en 2740 SIT con 53,816 aislamientos clínicos y 4,364 patrones huérfanos.

1.4.2.3. Métodos de Genotipificación Alternos

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas, algunas basadas en RFLP, como las de las secuencias IS1081 (136), PGRS (137), DR (138) o GTG (139).

Otras basadas en PCR como *Mixed-Linker* PCR (140), *Mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRU) (141), *Fast Ligation mediated* PCR (FLiP) (142), *Fluorescent amplified fragment length polymorphism* (FAFLP) (143), *Variable numbers of tandem repeats* (VNTR) (144), *Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences* (ERIC-PCR) (145) o *Ligation mediated* PCR (LMPCR) (146). Otras técnicas basadas en PCR con escaso poder de reproducción son *Double-repetitive-element* (DRE) (147), PCR inversa (148), *ampliprinting* (149) y PCR con iniciadores arbitrarios (150). De todas ellas, las que se están utilizando más son las técnicas MIRU-VNTR (*Mycobacterial interspersed repetitive unit-Variable numbers of tandem repeats*) y FAFLP (134).

1.4.3. Epidemiología molecular de *M. tuberculosis* en México

La técnica de genotipificación más extensamente usada en México para estudiar la transmisión de la TB es el RFLP-IS6110. El análisis de los patrones de RFLP de aislamientos clínicos de distintas localidades del país ha permitido estudiar la transmisión de cepas circulantes de *M. tuberculosis* dentro del país.

Se ha encontrado alta incidencia de agrupación de aislamientos resistentes en Tamaulipas y Chihuahua con 46% (83) y el Distrito Federal con 40% (85); y de aislamientos susceptibles en Nuevo León con 39% (90), lo que sugiere transmisión reciente y extensiva de TB en estas localidades. En Veracruz se encontró 36% de agrupación en el año 2000 (98-100), 17% en 2004 (101) y 25% en 2006 (151), sugiriendo una disminución de la transmisión reciente.

Por otro lado, los estudios más recientes gradualmente han introducido el análisis de spoligotipos, lo cual ha permitido identificar los principales genotipos predominantes

en el país: SIT19, SIT42, SIT47, SIT50, SIT53 y SIT119 (79, 83, 85, 92, 152-155). En Jalisco, particularmente se han reportado los SIT3, SIT8, SIT17, SIT33, SIT42, SIT53, SIT81, SIT119, SIT209, SIT804, SIT1243, SIT1711 (79, 154).

Los clados más predominantes en el país son Haarlem (H), el Latino Americano-Mediterráneo (LAM), el X de pocas copias *IS6110* y el aún sin definir clado T. Todos estos se han encontrado en casi todos los estados analizados (79, 83, 85, 92, 152-155). De acuerdo a la base mundial, estos son los genotipos que prevalecen en América. Los sublinajes más comúnmente detectados en el país son T1, LAM9, H3 y H1.

Globalmente, ciertas cepas de *M. tuberculosis* se han asociado con una gran proporción de infección reciente, sugiriendo que estas cepas pueden tener mayor facilidad de transmisión o una probabilidad más alta de causar infección poco después de la transmisión. SIT1 pertenece al genotipo Beijing, del linaje Asiático-Oriental (153), y se ha reportado que las cepas de *M. tuberculosis* tipo Beijing presentan mayor facilidad para transmitirse y causar la enfermedad (156), por lo tanto, son consideradas como cepas hipervirulentas (157). Aunque estas cepas se encuentran predominantemente en Asia, últimamente han presentado una distribución geográfica mundial (158). En México, a la fecha se conocen cuatro reportes de cepas de *M. tuberculosis* tipo Beijing: el primer reporte fue en una comunidad rural en Puebla en el 2008 (153), el segundo fue un aislamiento susceptible pediátrico en Jalisco en el 2011 (79), el tercero fue en aislamientos MFR de Baja California, Sinaloa y Veracruz (154) y el cuarto en aislamientos de San Luis Potosí (155).

De igual forma, sólo dos estudios en México ha reportado el análisis de diversidad genética de micobacterias usando MIRU-VNTR (85, 154), y en ambos estudios se determinó una alta diversidad genética.

En México se han elucidado las principales cepas (genotipos) circulantes de *M. tuberculosis*, al igual que la frecuencia de mutaciones asociadas a farmacorresistencia. Sin embargo, la información disponible en el país es limitada; casi la mitad de los estados Mexicanos siguen sin ser analizados. Teniendo en consideración que el índice de la TB en el país no ha disminuido considerablemente en los últimos años, se necesitan más estudios para poder evaluar mejor la dinámica de la transmisión de *M. tuberculosis* y cepas de *M. tuberculosis* farmacorresistentes.

2. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es la segunda causa de muerte por una enfermedad infecciosa a nivel mundial y es causada principalmente por *M. tuberculosis*. Se ha reportado una alta diversidad genética dentro de esta especie asociada a variación en la virulencia y resistencia a antifímicos.

En México, existen pocos estudios sobre la diversidad genética, resistencia a antifímicos y mutaciones asociadas a esta resistencia de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. Jalisco es uno de los estados en los cuales no se ha analizado ampliamente la caracterización genotípica y fenotípica de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Caracterizar genotípicamente aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*, determinar su perfil de resistencia a antifímicos y su correlación con mutaciones asociadas a esta resistencia.

3.2. Específicos

1. Identificar aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.
2. Obtener el perfil de resistencia a antifímicos de los aislamientos clínicos.
3. Detectar mutaciones en genes asociados a la resistencia de los antifímicos.
4. Determinar los spoligotipos presentes en la población de estudio.
5. Determinar la relación filogenética de los aislamientos y los genotipos predominantes.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

M. tuberculosis tiene un alto potencial de causar infecciones dentro del laboratorio, debido a su baja dosis infecciosa (mínimo aproximado de 10 bacterias inhaladas) y su capacidad de sobrevivir en micro-gotas. Por lo tanto, se deben de tomar precauciones de seguridad que excedan las normalmente usadas en los laboratorios de Microbiología.

Este trabajo se llevó a cabo en un laboratorio de Nivel de Bioseguridad II, en el Laboratorio de Micobacteriología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL. Se trabajó en una campana de seguridad biológica clase II (Labconco, Kansas, MO, EUA), la cual está equipada con un filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*), y el flujo dentro de la campana se ajustó a una presión de 0.5 pulgadas de agua. Se trabajó en una sección construida con un sistema de ventilación de una única entrada de aire para mantener la circulación en una sola dirección, con presión negativa. Se empleó ropa de protección especial: cubrebocas, bata de laboratorio, bata de laboratorio exclusiva para el área de trabajo y doble par de guantes.

Se empleó una solución de glutaraldehído al 2% como agente desinfectante, y etanol al 70% para la desinfección de superficies externas. Todo el material se desechó en bolsas rojas especiales y se esterilizó antes de descartarse.

4.1. Estrategia general

Se recolectaron muestras clínicas de pacientes con sospecha de tuberculosis provenientes de un hospital de Guadalajara, Jalisco, las cuales se procesaron mediante el método de descontaminación de Petroff, se les realizó la tinción de Ziehl-Neelsen y se cultivaron en medio Lowestein-Jensen a 37°C. A partir de los aislamientos clínicos se identificó la especie mediante pruebas fenotípicas y genotípicas y se determinó el perfil de farmacorresistencia fenotípico mediante los métodos de proporciones y MGIT. Para determinar la frecuencia de mutaciones en genes asociados a resistencia, se analizaron genes asociados a resistencia a INH (*katG*, *inhA* y *ahpC*) y RIF (*rpoB*), mediante PCR-RFLP y pirosecuenciación. Posteriormente, para la genotipificación, a todos los aislamientos se les realizó spoligotyping. Con los patrones genotípicos y el dendograma resultantes, junto con los perfiles de farmacorresistencia fenotípica y genotípica obtenidos, se determinó la relación filogenética y la probable transmisión de cepas resistentes, en base a la incidencia de los clústers, así como los genotipos predominantes en la población de estudio.

4.2. Población de estudio

Se recolectaron muestras clínicas de pacientes con sospecha de TB y con BAAR con resultado positivo previo, provenientes del Hospital Civil de Guadalajara y el Instituto de Patología Infecciosa y Experimental “Dr. Francisco Ruiz Sánchez” durante un año: septiembre del 2010 hasta noviembre del 2011. Estas muestras se procesaron en el Laboratorio de Micobacteriología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL.

4.3. Procesamiento de las muestras clínicas

Las muestras clínicas se procesaron mediante el método de descontaminación de Petroff, se les realizó la tinción de Ziehl-Neelsen para detectar BAAR y se cultivaron en medio Lowestein-Jensen a 37°C (159).

4.3.1. Descontaminación de Petroff

La mayor parte de las muestras clínicas están contaminadas con una flora bacteriana mixta que se multiplica más rápido que las micobacterias. Por ello, las muestras se procesaron con el método de descontaminación de Petroff (160). Se añadieron 10 mL de la muestra y 10 mL de NaOH 4% en un tubo estéril de fondo cónico. Se homogenizó la muestra en vórtex por 30 s. Se centrifugó por 15 min a 3000 rpm, se desechó el sobrenadante, se añadió una gota de azul de bromotimol al sedimento y se le añadió HCl 0.1 M hasta observar un viraje en el pH a color verde.

4.3.2. Tinción de Ziehl-Neelsen

Después de la descontaminación y procesamiento de la muestra, con una pipeta Pasteur se transfirió una gota a un portaobjetos y se fijó con calor en una plancha de calentamiento. Se cubrió con fucsina fenicada por 15 min, se lavó con agua destilada, se añadió ácido-alcohol para decolorar, se lavó de nuevo y se añadió azul de metileno por 3 min. Después de lavar de nuevo se examinó al microscopio de luz visible con un objetivo de inmersión (100X). Los BAAR se tiñeron en rojo brillante sobre un fondo azulado, de 1 a 10 μm de longitud y de 0.2 a 0.6 μm de ancho (3). Al menos 300 campos se analizaron antes de considerar una tinción como negativa. Para realizar la interpretación de los resultados, se siguieron los siguientes criterios:

BAAR observados	Reporte
Ninguno	Negativo
1-2 en 300 campos	±
1-9 en 100 campos	+
1-9 en 10 campos	++
1-9 en 1 campo	+++
> 9 en 1 campo	++++

4.3.3. Cultivo en Löwenstein-Jensen

Posteriormente se inocularon 0.5 mL de la muestra en medio de Löwenstein-Jensen en tubos de vidrio con tapón de rosca. Este es un medio sólido a base de huevo, glicerol, sales y verde de malaquita, solidificado por calentamiento de 85° a 95°C durante 30-45 min. Los tubos Löwenstein-Jensen se incubaron a 37°C en una atmósfera de un 5-10% CO₂ al menos durante los primeros 7-15 días. Todos los cultivos se incubaron durante un mínimo de 8 semanas, antes de considerarlos negativos (3, 159).

4.4. Aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*

Normalmente de 2 a 3 semanas puede observarse la presencia de colonias en el medio, pero puede tardarse incluso hasta 8 semanas. En aquellos cultivos donde aparecieron colonias irregulares, rugosas, no pigmentadas, parecidas a migajas de pan en medio Löwenstein-Jensen, se les consideró como candidatos para realizar las pruebas fenotípicas (3, 159).

4.5. Identificación de *M. tuberculosis*

Una vez aisladas las colonias se identificó la especie mediante pruebas bioquímicas tradicionales (producción de niacina y reducción de nitrato) y pruebas genotípicas (presencia de Regiones de Diferencia).

4.5.1. Pruebas fenotípicas

Se realizaron dos pruebas bioquímicas para identificar a nivel de CMT, las pruebas de reducción de nitrato y producción de niacina, para las cuales especies del CMT presentan resultados positivos (3). Para ambas pruebas se utilizó como control positivo la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y una cepa de *M. bovis* como control negativo.

4.5.1.1. Reducción del nitrato

En un cultivo de 3 a 4 semanas del aislamiento a identificar, se le dispensó al tubo de Löwenstein-Jensen 2.5 mL de un sustrato amortiguador para el nitrato y se dejó incubando, con el tubo inclinado, a 37°C por 2 h. Luego, se transfirió 1 mL de este sustrato a otro tubo. En éste, se añadió 1 gota de HCl 50%, luego 2 gotas de sulfanilamida 0.2% y 2 gotas de *N*-(1-naftil) etilendiamina 0.1%. Si se presentó un cambio de color, de transparente a rosado-rojo, se consideró como positivo.

4.5.1.2. Producción de la niacina

En un cultivo de 3 a 4 semanas del aislamiento a identificar, se le dispensaron 2.5 mL de agua estéril al tubo de Löwenstein-Jensen y se realizó una serie de hendiduras en el medio con un asa, consiguiendo que el agua entre en contacto y extraiga la niacina liberada en el medio. Luego, se transfirió 1 mL de este sustrato a otro tubo y se añadieron 2 gotas de anilina y 2 gotas de bromuro de cianógeno. Si se presentó un cambio de color, de transparente a amarillo, se consideró como positivo.

4.5.2. Pruebas genotípicas

Todos los aislamientos positivos para las pruebas fenotípicas fueron candidatos para realizar la identificación mediante pruebas genotípicas. Se amplificaron tres genes conservados (regiones de diferencia, RD) reportados anteriormente: *cfp32*, RD12 y RD9, que permiten diferenciar *M. tuberculosis* del resto de las especies del CMT (27).

4.5.2.1. Extracción de DNA por lisis enzimática

La extracción de DNA genómico se realizó mediante el método de lisis enzimática con lisozima (Biotech, Bio Basic, Inc, Ontario, Toronto, Canadá) y proteinasa K (Bioline USA Inc, Taunton, MA, EUA) (161). Primero, las colonias de un cultivo joven se inactivaron en un tubo eppendorf estéril a 80°C durante 1 h en agua estéril en baño de agua (Lab-Line Imperial IV, Lab Extreme Inc, Kent, MI, EUA), se centrifugaron por 5 min a 8,000 rpm (Hermle Z 233 MK-2, Labnet, Woodbridge, NJ, EUA), se desechó el sobrenadante y el sedimento restante se resuspendió con Tris-HCl 100 mM y lisozima (1mg/mL) y se incubó toda la noche a 37°C en baño maría. Se añadió TE 1X con SDS 1% y proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó por 2 h a 55°C. Posterior a esto se añadió fenol saturado, SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico; 24:1) y TE 1X, se mezcló por inversión por 5 min y se centrifugó 8 min a 14,000 rpm. Este último paso se repitió dos veces. Se recuperó la fase acuosa, se añadieron 2.33 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitando al menos 20 min a -20°C. Luego se centrifugó por 5 min a 14,000 y el sedimento se lavó con etanol al 70% dos veces. Posteriormente se dejó secando toda la noche, se resuspendió en TE 1X y se incubó a 65°C por 15 min. La cuantificación del DNA se llevó a cabo en un espectrofotómetro de UV (Beckman Coulter, Brea, CA, Estados Unidos).

4.5.2.2. Amplificación de regiones de diferencia

Las amplificaciones de tres RD: *cfp32*, RD12 y RD9 (16) se realizaron a un volumen final de 25 μ L que contenía 1X de buffer de PCR (NH_4 1X pH 8.8), 2.5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de cada dNTP, 200 nM de cada iniciador (Instituto de Biotecnología, UNAM, México), 1 U de Taq DNA polimerasa (Bioline USA Inc, Taunton, MA, EUA) y 200 ng de DNA. Los genes *cfp32* y RD12 se amplificaron en una PCR múltiple con las siguientes condiciones: un paso inicial de desnaturalización a 96°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 96°C por 10 s, 60°C por 20 s y 72°C por 1 min, terminando con un paso de extensión final a 72°C por 5 min. El gen RD9 se amplificó con un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 25 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min, terminando con un paso de extensión final a 72°C por 10 min (Termocicladores: PCR Sprint, Hybaid y PxE 0.2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, Madison, WI, EUA; y MultiGene, Labnet, Woodbridge, NJ, EUA).

Posteriormente los productos se corrieron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (2 μ g/mL) en una cámara de electroforesis (Maxicell Primo EC 340, Thermo EC, Holbrook, NY, EUA) a 100 V por 45 min en TBE 0.5X, empleando un marcador de 100-1,000 pb (HyperLadder™ IV, Bioline USA Inc, Taunton, MA, EUA).

Las bandas del gel se visualizaron en un transiluminador de UV a 254 nm empleando un fotodocumentador (EpiChemi 3 Darkroom, UVP Bioluming Systems, Upland, CA, EUA). Las imágenes fueron documentadas en formato digital mediante el software Labworks (Lablogics Business Solutions, Mission Viejo, CA, EUA). En la Tabla 2 se muestra el tamaño de los productos esperados. Con esta PCR, el aislamiento que mostró las tres regiones fue identificado como *M. tuberculosis* (17).

TABLA 2. Iniciadores utilizados en la identificación de *M. tuberculosis*

Gen		Secuencia (5'-3')	Producto (pb)
<i>cfp32</i>	<i>Forward</i>	ATGCCCAAGAGAAGCGAATACAGGCAA	786
	<i>Reverse</i>	CTATTGCTGCGGTGCGGGCTTCAA	
RD9	<i>Forward</i>	TCGCCGCTGCCAGATGAGT	600
	<i>Reverse</i>	TTTGGGAGCCGCGGTGGTGATGA	
RD12	<i>Forward</i>	GTCGGCGATAGACCATGAGTCCGTCTCCAT	404
	<i>Reverse</i>	GCGAAAAGTGGGCGGATGCCAG	

4.6. Perfil de farmacoresistencia

El perfil de resistencia a antifímicos de los aislamientos se determinó mediante dos métodos fenotípicos ya reportados: el método establecido de proporciones (72) y el sistema MGIT (73). Los antifímicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Toluca, México).

4.6.1. Método de proporciones

Se tomó una colonia de un cultivo de *M. tuberculosis* no mayor de 4 semanas con un aplicador, se suspendió en 2 mL de solución salina en un tubo de vidrio y se ajustó la turbidez al 0.5 ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL aproximadamente) de la escala de McFarland. Se realizaron diluciones 1:10 en solución salina hasta 10^{-4} y las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} se inocularon (0.5 mL) cada una en series de tubos con medio Löwestein-Jensen, los cuales previamente se prepararon con concentraciones establecidas de antifímicos (STR: 4.0 µg/mL, INH: 0.2 µg/mL, RIF: 40.0 µg/mL, EMB: 2.0 µg/mL) (72). Se inoculó además un tubo con medio sin antifímico para cada dilución, el cual se consideró como control negativo. Estos tubos se incubaron a 37°C por un periodo de 28 días y posteriormente se realizó el conteo de colonias presentes comparando con el grupo control.

La resistencia se expresó como la proporción de colonias que crecieron en medio con antifímico comparado con medio sin antifímico y la proporción crítica de resistencia fue de 1% para todos los antifímicos.

4.6.2. Método de MGIT

Se tomó una colonia de un cultivo de *M. tuberculosis* no mayor de 14 días, se suspendió en 2 mL de solución salina y se ajustó la turbidez al 0.5 de la escala de McFarland. Se realizaron diluciones 1:10 en solución salina hasta 10^{-5} y esta última se inoculó en tubos MGIT (Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA), los cuales previamente se prepararon con concentraciones establecidas de antifímicos (STR: 0.8 µg/mL, INH: 0.1 µg/mL, RIF: 1.0 µg/mL, EMB: 3.5 µg/mL) (162). Se inoculó además un tubo MGIT sin antifímico para cada dilución, el cual se consideró como control negativo. Estos tubos se incubaron a 37°C por un periodo de 3 a 12 días hasta que el tubo control se mostrara positivo. La lectura se realizó en el transiluminador de UV a 356 nm mediante la determinación de la presencia o ausencia de fluorescencia.

4.7. Mutaciones en genes asociados a resistencia

4.7.1. Amplificación de genes asociados a resistencia

Se analizaron genes asociados a resistencia a INH: *katG*, *inhA* y *ahpC*, así como también el gen asociado a resistencia a RIF, *rpoB*. Los iniciadores usados para las amplificaciones de estos genes están listados en la Tabla 3 (Alpha DNA, Montreal, Canadá) (97, 163). La PCR del gen *katG* se realizó con una mezcla de reacción con una concentración final de 1x de buffer de PCR, 3 mM de MgCl₂, 0.15 mM de cada dNTP, 300 nM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerasa y 200 ng de DNA. Las

condiciones utilizadas fueron las siguientes: 10 ciclos de 15 s a 95°C, 1 min a 68°C y 15 s a 72°C, seguido de otros 25 ciclos de 15 s a 95°C, 15 s a 68°C y 15 s a 72°C (164).

Las amplificaciones de *inhA*, *ahpC* y *rpoB* se realizaron a un volumen final de 50µL que contenía 1x de buffer de PCR, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 200 nM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerasa y 200 ng de DNA. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido de 45 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s y 72°C por 30 s, terminando con un paso de extensión final a 72°C por 5 min (97). Se llevó a cabo la electroforesis de los productos en gel de agarosa al 2% con 2 µg/mL de bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en el transiluminador de UV. En la Tabla 3 se muestra el tamaño de los productos esperados.

TABLA 3. Iniciadores utilizados en las PCR y secuenciaciones de genes asociados a resistencia

Gen		Secuencia (5' → 3')	Producto (bp)	Ref.
<i>inhA</i>	<i>Forward</i>	Biotina-GAGCGTAACCCAGTGCGAAAG	162	(97)
	<i>Reverse</i>	CCAGGACTGAACGGGATACGAATG		
	<i>Sequencing</i>	TGGCAGTCACCCC		
<i>ahpC</i>	<i>Forward</i>	Biotina-CGGCACTGCTGAACCACTG	184	(97)
	<i>Reverse</i>	CCTCATCATCAAAGCGGACAATG		
	<i>Sequencing</i>	CATTTGGTTGCGACAT		
<i>katG</i>	<i>Forward</i>	GGTCGACATTCGCGAGACGTT	519	(163)
	<i>Reverse</i>	CGGTGGATCAGCTTGTACCAG		
<i>rpoB</i>	<i>Forward</i>	GCGATCAAGGAGTTCTT	215	(97)
	<i>Reverse</i>	Biotina-CGATCAGACCGATGTTGG		
	<i>Sequencing 1</i>	CCAGCTGAGCCAATTC		
	<i>Sequencing 2</i>	TGTCGGGGTTGACC		
	<i>Sequencing 3</i>	CCACAAGCGCCGA		

4.7.2. Digestión enzimática del gen *katG* (PCR-RFLP)

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente forma: 1 U de MspAII (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA), 5 µL de producto de PCR de *katG*, 0.2 µL de albúmina de suero bovino (BSA, 100 µg/mL), 2 µL de buffer de digestión 10X (New England Biolabs buffer 4) y agua destilada a un volumen final de 20 µL. Se mezcló en vórtex, se centrifugó por 5 s a 11,000 g y se incubó por 3 h a 37°C. Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis de los productos en gel de agarosa al 2% con 2 µg/mL de bromuro de etidio en una cámara de electroforesis. Este gel se sometió a 100 V por un periodo de 40 min y las bandas se visualizaron en el transiluminador de UV. Una banda de 309 pb indicó un codon *katG315* silvestre, mientras que una banda de 377 pb indicó un codón *katG315* mutante (164).

4.7.3. Pirosecuenciación de los genes *rpoB*, *inhA* y *ahpC*

Los productos biotinilados fueron posteriormente sometidos a pirosecuenciación con iniciadores reportados anteriormente y mediante el método estandarizado (97, 165). Los productos de PCR biotinilados (40 µL) se inmovilizaron en una suspensión de 3 µL de perlas de sefarosa cubiertas con estreptavidina (GE Healthcare, Biosciences AB, Upsala, Suiza) en 40 µL de buffer de unión. Las muestras se incubaron por 10 min en agitación constante y después de la inmovilización, los complejos perlas-templados se sumergieron en etanol al 70% y solución desnaturalizante (NaOH 0.2M).

Las muestras ya desnaturalizadas posteriormente se lavaron en buffer de lavado (Tris-Base pH 7.6) y los complejos perlas-templados de cadena sencilla se transfirieron a una placa de 96 pozos con buffer de alineamiento y iniciadores de secuenciación respectivos a cada gen (Tabla 3). El alineamiento se llevó a cabo a 90 °C por 2 min en

un thermoblock (Orbit LS, Labnet, Woodbridge, NJ, EUA) y los templados se dejaron a temperatura ambiente mientras se preparó la mezcla de reacción para la secuenciación. Posteriormente se llevó a cabo la transferencia de los complejos perlas-templados empleando el dispositivo del pirosecuenciador y la pirosecuenciación se llevó a cabo en el pirosecuenciador PSQ SNP 96 (Biotage, Inc., Qiagen, Hilden, Alemania).

Las regiones a analizar por este método fueron las siguientes: *inhA*, una región de 20 pares de bases (-24 a -4); *ahpC*, una región de 35 pares de bases (-39 a -4) y por último, una región en *rpoB* de 57 pares de bases (del codón 515 a 533). Esta región se analizó con tres secuenciaciones separadas, la primera de la región 515-526, la segunda de la región 526-531 y la tercera secuenciación de la región 531-533 (97).

4.7.4. Análisis estadístico

Los resultados de farmacorresistencia fenotípica se compararon con el análisis de mutaciones en genes asociados a farmacorresistencia de cada aislamiento. El análisis estadístico se realizó usando OpenEpi (*Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*, Version 2.3.1. www.OpenEpi.com, actualizado 2011/23/06, acceso 2012/09/25). Se usó la prueba Chi-cuadrada con la corrección de Yates para continuidad para comparar entre los grupos susceptible y resistente. Los valores de P menores de 0.05 fueron considerados como significativos.

La concordancia entre los resultados de los métodos de proporciones y MGIT se evaluó usando el coeficiente Kappa (κ). Los valores Kappa indican concordancia débil (≤ 0.40), moderada (0.41-0.60), fuerte (0.61-0.80), o excelente (>0.80). El software estadístico para Windows, IBM SPSS (SPSS versión 20.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) se usó para este análisis.

4.8. Genotipificación de *M. tuberculosis*

4.8.1. Spoligotyping

Todos los aislamientos fueron genotipificados con un kit comercial de *Spoligotyping* (Isogen Lifesciences, Ocimum Biosolutions, Inc, De Meern, Países Bajos) de acuerdo a la técnica estandarizada (131, 134).

Amplificación de DR. Las regiones espaciadoras en el DR del genoma de *M. tuberculosis* se amplificaron usando los iniciadores DRa y DRb (DRa: 5'-Biotina-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3' y DRb: 5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'), uno de los cuales se encuentra biotinilado. La PCR se realizó en un volumen final de 50 μ L que contenía 1x de buffer de PCR (NH_4 1X pH 8.8), 2 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de cada dNTP, 200 nM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerasa y 20 ng de DNA. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 96°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 96°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 30 s, terminando con un paso de extensión final a 72°C por 5 min. DNA de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG se usaron como controles.

Hibridación. Los productos de PCR biotinilados fueron hibridados a una spoligo-membrana con un set de 43 oligonucleótidos correspondientes a cada espaciador (incluida en el kit). Para ello, 20 μ L de los productos de PCR se añadieron a 150 μ L de buffer SSPE 2X/SDS 0.1%, se desnaturalizaron por 10 min a 99°C (Orbit LS, Labnet, Woodbridge, NJ, EUA) y se enfriaron rápidamente. La membrana se lavó por 5 min a 60°C en 250 mL del buffer SSPE 2X/SDS 0.1% y se colocó junto con un soporte acolchonado en un miniblatter (MN45, Isogen Lifesciences, Ocimum Biosolutions, Inc, De Meern, Países Bajos), de forma que las ranuras estuvieran perpendiculares al patrón

de líneas de los oligonucleótidos unidos. Los productos diluidos se añadieron a las ranuras y se hibridó por 60 min a 60°C.

Posteriormente, mediante aspiración se retiraron los productos del miniblotter, se retiró la membrana y se lavó dos veces en 250 mL del buffer SSPE 2X/SDS 0.5% por 10 min a 60°C. Se dejó la membrana enfriando con agitación para prevenir la inactivación de la enzima peroxidasa en el siguiente paso.

Etiquetado. Se añadieron 2.5 µL del conjugado estreptavidina-peroxidasa (500U/mL, Sigma-Aldrich, Toluca, México) a 10 mL de SSPE 2X/SDS 0.5% y se incubó la membrana en esta solución de 45 a 60 min a 42°C en agitación. La membrana después se lavó dos veces en 250 mL de SSPE 2X/SDS 0.5% por 10 min a 42°C y después en 250 mL de SSPE 2X dos veces por 5 min a temperatura ambiente.

Detección. Para la detección quimioluminiscente, la membrana se incubó por 1 min en 20 mL de los reactivos de detección del kit ECL, se cubrió con plástico transparente, y se expuso a una película sensible a luz por 20 min.

Interpretación. Los patrones obtenidos se analizaron y se convirtieron a un formato binario, usando “1”, cuando se detectó hibridación, y “0”, cuando no se detectó hibridación. Este código binario luego se separó en 14 grupos de tres y el espaciador 43 no agrupado. Cada triplete binario se designó con un código octal de la siguiente forma: 000=0, 001=1, 010=2, 011=3, 100=4, 101=5, 110=6, 111=7; y el último espaciador (43) de la siguiente forma: 0=0, 1=1. Este código octal posteriormente se ingresó en la base de datos internacional SITVIT WEB del Instituto Pasteur de Guadalupe, en la página web: http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/. En esta base, los números del tipo internacional de spoligo (SIT) designan los spoligotipos compartidos por dos o más aislamientos de pacientes, mientras que los patrones designados como

“huérfanos” se reportan para un solo aislamiento. Se construyó un dendograma usando el método de agrupamiento de pares no ponderados con algoritmo del vecino más próximo con la aplicación MIRU-VTRN*plus* (166).

Lavado de membrana. La membrana se regeneró para su posterior re-uso mediante dos lavados en SDS 1% a 80°C por 30 min y un lavado en EDTA 20mM pH8, por 15 min a temperatura ambiente. Después se almacenó sellada a 4°C.

4.8.2. Análisis filogenético y genotipos predominantes

Con los patrones de spoligotyping y el dendograma resultantes, se determinó la relación filogenética entre los aislamientos y se determinó si hubo alta o baja incidencia de clústers o agrupaciones. Estos resultados luego se conjuntaron con los perfiles de farmacorresistencia fenotípica y genotípica obtenidos, y así se determinó si hubo transmisión de cepas resistentes, en base a la incidencia de los clústers.

Por otro lado, se determinó también la frecuencia de los spoligotipos encontrados y se determinaron los genotipos predominantes en la población de estudio, así también estableciendo si estos fueron farmacorresistentes.

Todos estos resultados se compararon con otros estudios realizados en el país y en otros países, para determinar si existe diferencia en la población de cepas circulantes de *M. tuberculosis* en Guadalajara, respecto a la frecuencia de farmacorresistencia y genotipos predominantes.

5. RESULTADOS

5.1. Aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*

En total se procesaron 351 muestras clínicas, de las cuales 96 (27.4%) fueron BAAR positivo y 130 (37%) presentaron un cultivo positivo. Entre las muestras que resultaron BAAR positivo, 13 (3.7%) no mostraron cultivo positivo. De las muestras que presentaron cultivo positivo, 112 (32%) fueron candidatas a que se les realizaran pruebas de identificación fenotípica, ya que 18 (5%) presentaron un cultivo disgónico, es decir, las colonias no crecieron en abundancia.

De estos 112 aislamientos, 105 (93.75%) se identificaron como *M. tuberculosis* mediante pruebas fenotípicas y genotípicas [37 (35%) presentaron BAAR negativo]. Los otros 7 (6.25%) aislamientos fueron identificados como especies distintas a *M. tuberculosis* por pruebas fenotípicas, y mediante pruebas genotípicas, 6 (5.4%) de éstos fueron identificados como especies que no pertenecen al CMT y 1 (0.9%) como *M. bovis* o *M. caprae* (Tabla 4).

Por lo tanto, estos 105 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* se incluyeron en el presente trabajo. Estos aislamientos fueron recuperados en su mayoría de muestras de expectoración (93%), pero también se aislaron de muestras como aspiración transtraqueal (2%), aspirado bronquial (2%), lavado gástrico (1%), orina (1%) y biopsia de ganglio linfático (1%).

TABLA 4. Características de las muestras e identificación de los aislamientos

No (%) muestras	Cultivo	Pruebas Fenóticas		Identificación Fenotípica	Pruebas Genotípicas			Identificación Genotípica
		Niacina	Nitrato		<i>cfp32</i>	RD12	RD9	
105 (80.8)	+	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
1 (0.8)	+	-	-	No <i>M. tuberculosis</i>	+	-	-	<i>M. bovis/M. caprae</i>
3 (2.3)	+	-	+	No <i>M. tuberculosis</i>	-	-	-	MNT
3 (2.3)	+	-	-	No <i>M. tuberculosis</i>	-	-	-	MNT
18 (13.8)	+*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*Cultivo disgónico; Niacina: Producción de Niacina; Nitrato: Reducción de Nitrato; ND: No Determinado; MNT: Micobacterias No Tuberculosas.

5.2. Perfil de farmacorresistencia fenotípico

Los resultados de susceptibilidad a los antifímicos se muestran en la Tabla 5, donde se comparan los resultados de los métodos de proporciones y MGIT. El 49.5% (52/105) de los aislamientos presentó resistencia al menos a un antifímico por alguno de los dos métodos. El 50.5% (53/105) de los aislamientos fueron susceptibles a los antifímicos por ambos métodos. En general, el método de MGIT mostró un nivel más alto de detección de FR, puesto que se detectó el 48.6% (51/105) de los aislamientos como FR mientras que por el método de proporciones se detectó el 38.1% (40/105) de los aislamientos como FR.

Por el método de MGIT, la resistencia a INH y RIF se detectó en el 40% (42/105) y en el 20% (21/105) de los aislamientos, respectivamente, y por el método de proporciones, se detectó en el 26.6% (28/105) y en el 18.1% (19/105) de los aislamientos, respectivamente. De igual forma, se detectó MFR en el 19% (20/105) y en el 17.1% (18/105) de los aislamientos, respectivamente.

Se detectó monorresistencia a INH en el 13.3% (14/105) y en el 4.8% (5/105) de los aislamientos por el método de MGIT y proporciones, respectivamente, y monorresistencia a RIF sólo se detectó en el 0.95% (1/105) de los aislamientos por el método MGIT. En contraste, monorresistencia a STR se detectó de forma más sensible por el método de proporciones, puesto que se detectó en el 7.6% (8/105) de los aislamientos y por MGIT se detectó en el 5.7% (6/105) de los aislamientos.

De igual forma se detectó la resistencia a EMB y también fue mejor detectada por el método de proporciones, puesto que se detectaron patrones IRE (isoniazida, rifampicina y etambutol) y SIRE (estreptomicina, isoniazida, rifampicina y etambutol) en el 5.7% (6/105) y en el 6.7% (7/105) de los aislamientos, respectivamente, contrario al 3.8% (4/105) y al 5.7% (6/105) de los aislamientos, respectivamente, que se detectaron por el método de MGIT. La monorresistencia a EMB se detectó en el 0.95% (1/105) y en el 1.9% (2/105) de los aislamientos por el método MGIT y de proporciones, respectivamente. Los patrones de polirresistencia detectados por el método MGIT fueron SI (estreptomicina e isoniazida, 4.8%, 5/105), SE (estreptomicina y etambutol, 0.95%, 1/105) y SIE (estreptomicina, isoniazida y etambutol, 2.9%, 3/105), mientras que los patrones detectados por el método de proporciones fueron SI (0.95%, 1/105), SE (estreptomicina y etambutol, 1.9%, 2/105), SIE (estreptomicina, isoniazida y etambutol, 2.9%, 3/105) y SRE (estreptomicina, rifampicina y etambutol, 0.95%, 1/105).

El análisis de concordancia de ambos métodos mostró diferencias en cada fármaco estudiado: los resultados de resistencia a RIF y STR mostraron excelente concordancia ($\kappa=0.969$ y $\kappa=0.950$, respectivamente) mientras que los resultados de resistencia a INH y EMB mostraron fuerte concordancia ($\kappa=0.666$ y $\kappa=0.744$,

respectivamente). En general, el análisis de todos los fármacos (SIRE) mostró fuerte concordancia ($\kappa=0.639$).

TABLA 5. Perfiles de farmacoresistencia de aislamientos de *M. tuberculosis*

Farmacoresistencia	No. (%) de aislamientos	
	Proporciones	MGIT
Susceptible	65 (61.9)	54 (51.4)
Resistencia a uno o más antifímicos	40 (38.1)	51 (48.6)
Monoresistencia	15 (14.3)	22 (20.1)
INH	5 (4.8)	14 (13.3)
RIF	0 (0)	1 (0.95)
STR	8 (7.6)	6 (5.7)
EMB	2 (1.9)	1 (0.95)
Polirresistencia	7 (6.7)	9 (8.6)
STR, INH	1 (0.95)	5 (4.8)
STR, EMB	2 (1.9)	1 (0.95)
STR, INH, EMB	3 (2.9)	3 (2.9)
STR, RIF, EMB	1 (0.95)	0 (0)
MFR	18 (17.1)	20 (19)
INH, RIF	0 (0)	2 (1.9)
INH, RIF, EMB	7 (6.7)	5 (4.8)
STR, INH, RIF	4 (3.8)	7 (6.7)
STR, INH, RIF, EMB	7 (6.7)	6 (5.7)

STR: Estreptomina, INH: Isoniazida, RIF: Rifampicina, EMB: Etambutol; MFR: Multifarmacoresistencia; MGIT: *Mycobacterial Growth Indicator Tube*.

5.3. Perfil de farmacoresistencia genotípico

El análisis del gen *rpoB* en todos los aislamientos estudiados mostró sólo un sitio de mutación asociado a resistencia a RIF en la región analizada, *Ser531Leu* (Tabla 6). Este sitio presentó un cambio de TCG→TTG, el cual se encontró en el 48% (10/21) de

los aislamientos resistentes a RIF. Ninguno de los aislamientos susceptibles mostró esta mutación.

En el gen *ahpC* se encontraron dos mutaciones, ambas una sustitución C→T situadas en las posiciones -15 y -10 de la región promotora. El 24% (10/42) de los aislamientos resistentes a INH presentó mutación en la posición -15 y sólo el 2% (1/42) presentó una mutación en la posición -10. De estos, el 36% (4/11) no mostró otras mutaciones y el 45% (5/11) también mostró mutaciones en los genes *inhA* y *rpoB*.

Además, el 29% (18/63) de los aislamientos susceptibles a INH también presentó una mutación en *ahpC* (Tabla 6). El análisis estadístico mostró que hubo diferencia significativa en la mayoría de los genes analizados (*katG*: p<0.05; *inhA*: p<0.05; *rpoB*: p<0.0001), no obstante, la presencia de la mutación en el gen *ahpC* entre los grupos resistentes y susceptibles no mostró diferencias significativas (p=0.9645).

TABLA 6. Mutaciones en genes asociados a farmacorresistencia de aislamientos de *M. tuberculosis*

Farmacorresistencia	Gen	Codón o Nucleótido	Mutación	Frecuencia (%)
Resistencia a RIF	<i>rpoB</i>	531	TCG → TTG	10/21 (48)
Resistencia a INH	<i>katG</i>	315	AGC → ACC	6/42 (14)
		<i>inhA</i>	-15	C → T
	-17		C → T	1/42 (2)
	<i>ahpC</i>		-15	C → T
		-10	C → T	18 ^a /63 (29)
				1/42 (2)

^aFenotipo susceptible

Los perfiles de farmacorresistencia fenotípica se compararon con las mutaciones encontradas en cada aislamiento (Tabla 7). Todos los aislamientos mutados en *rpoB*

(n=10) presentaron un fenotipo MFR y el 73% (8/11) de los aislamientos mutados en *inhA*, también presentaron mutación en *rpoB*, y por lo tanto, un fenotipo MFR (Tabla 7). Por otro lado, todos los aislamientos mutados en *katG* (n=6) presentaron monorresistencia a INH, y en el 55% (6/11) de los aislamientos mutados en *ahpC* se detectó fenotipo MFR.

TABLA 7. Perfiles de farmacorresistencia de aislamientos de *M. tuberculosis*

No (%) aislamientos	Farmacorresistencia		Mutaciones Detectadas
	Proporciones	MGIT	
41 (39)	Ninguna	Ninguna	Ninguna
12 (11)	Ninguna	Ninguna	<i>ahpC</i> (-15)
1 (0.95)	Ninguna	R	<i>ahpC</i> (-15)
1 (0.95)	E	Ninguna	<i>ahpC</i> (-15)
1 (0.95)	E	E	<i>ahpC</i> (-15)
4 (3.8)	Ninguna	I	<i>ahpC</i> (-15)
3 (2.9)	Ninguna	I	<i>katG315</i>
2 (1.9)	Ninguna	I	Ninguna
1 (0.95)	Ninguna	I	<i>inhA</i> (-15)
2 (1.9)	I	I	<i>katG315</i>
1 (0.95)	I	I	<i>katG315, ahpC</i> (-15)
1 (0.95)	I	I	<i>inhA</i> (-17)
1 (0.95)	I	SI	Ninguna
1 (0.95)	Ninguna	S	Ninguna
3 (2.9)	S	S	<i>ahpC</i> (-15)
2 (1.9)	S	S	Ninguna
2 (1.9)	S	SI	Ninguna
1 (0.95)	SE	SI	<i>inhA</i> (-15)
1 (0.95)	S	SE	Ninguna
1 (0.95)	SE	SIE	Ninguna
1 (0.95)	SIE	SI	Ninguna

TABLA 7. (Continuación...)

2 (1.9)	SIE	SIE	Ninguna
1 (0.95)	SI	SIR	Ninguna
1 (0.95)	SRE	SIR	Ninguna
4 (3.8)	SIR	SIR	Ninguna
1 (0.95)	IRE	IR	Ninguna
1 (0.95)	IRE	IR	<i>ahpC</i> (-10), <i>rpoB531</i>
3 (2.9)	IRE	IRE	<i>inhA</i> (-15), <i>ahpC</i> (-15), <i>rpoB531</i>
2 (1.9)	IRE	IRE	<i>inhA</i> (-15), <i>rpoB531</i>
1 (0.95)	SIRE	SIR	<i>inhA</i> (-15), <i>rpoB531</i>
3 (2.9)	SIRE	SIRE	Ninguna
2 (1.9)	SIRE	SIRE	<i>inhA</i> (-15), <i>ahpC</i> (-15), <i>rpoB531</i>
1 (0.95)	SIRE	SIRE	<i>rpoB531</i>

S: Estreptomicina, I: Isoniazida, R: Rifampicina, E: Etambutol; MGIT: *Mycobacterial Growth Indicator Tube*.

5.4. Genotipos de *M. tuberculosis*

Para determinar los genotipos y familias genéticas de los aislamientos de *M. tuberculosis*, se les realizó spoligotyping a todos los aislamientos.

5.4.1. Spoligotipos de los aislamientos de *M. tuberculosis*

Se obtuvieron 31 patrones de spoligotipos diferentes de los 68 aislamientos. Entre ellos, se detectaron 3 aislamientos huérfanos con patrón único, no reportados en la base de datos (Tabla 8).

Un total de 27 SIT (Tipo Internacional de Spoligotipo) comprendiendo a 63 aislamientos concordaron con un tipo compartido preexistente en la base de datos SITVIT WEB, mientras que un SIT comprendiendo 2 aislamientos fue recientemente creado en este estudio (Tabla 9).

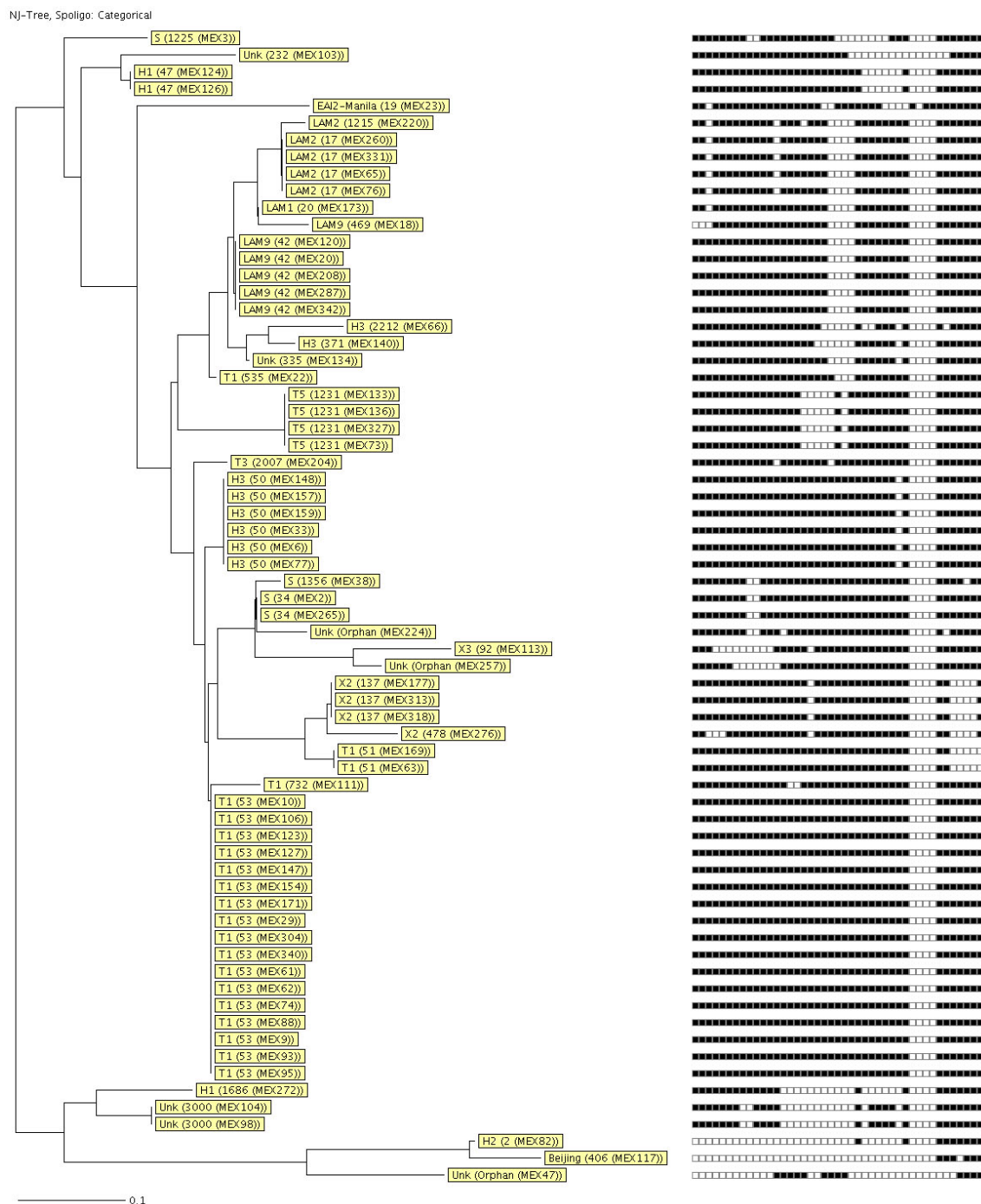


Figura 1. Dendrograma de aislamientos de *M. tuberculosis* en base a su spoligotipo (n = 68), usando el software MIRU-VNTR *plus*. Se muestra el linaje y SIT, como se definen en la base de datos SITVIT2 perteneciente al Instituto Pasteur de Guadeloupe, y la identificación de cada aislamiento.

En la Tabla 10 se muestran los patrones de FR de los distintos SIT encontrados. Entre los aislamientos MFR, el 12.8% (6/13) pertenecieron a un clúster: SIT53 (n=3), SIT137 (n=3); el resto presentó patrones únicos.

TABLA 10. Patrones de farmacoresistencia en SIT encontrados en este estudio

Aislamiento	SIT	Linaje	INH	RIF	STR	EMB
MEX65	17	LAM2	R	S	R	S
MEX76	17	LAM2	S	S	R	S
MEX331	17	LAM2	S	S	R	S
MEX23	19	EAI2-Manila	R	S	R	R
MEX2	34	S	R	S	S	S
MEX265	34	S	R	S	R	R
MEX208	42	LAM9	R	S	R	S
MEX157	50	H3	R	S	S	S
MEX159	50	H3	R	S	S	S
MEX63	51	T1	R	R	R	R
MEX169	51	T1	R	S	S	S
MEX10	53	T1	R	R	R	S
MEX61	53	T1	R	R	R	S
MEX74	53	T1	S	S	S	R
MEX88	53	T1	R	S	R	R
MEX95	53	T1	R	S	S	S
MEX105	53	T1	R	R	R	R
MEX171	53	T1	R	S	S	S
MEX177	137	X2	R	R	R	R
MEX313	137	X2	R	R	S	S
MEX318	137	X2	R	R	S	S
MEX134	335	Unk	R	R	R	R
MEX140	371	H3	R	R	R	S
MEX117	406	Beijing	R	R	R	R

TABLA 10. (Continuación...)

MEX18	469	LAM9	R	R	R	R
MEX276	478	X2	S	R	S	S
MEX22	535	T1	S	S	R	R
MEX111	732	T1	R	S	S	S
MEX220	1215	LAM2	R	S	S	S
MEX73	1231	T5	R	S	R	S
MEX133	1231	T5	R	R	R	S
MEX327	1231	T5	R	S	R	R
MEX66	2212	H3	R	R	R	S

SIT: *Shared International Type*; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; EMB: etambutol.

Los SIT34 del sublinaje S, SIT51, SIT53 y SIT732 del sublinaje T1, SIT1215 del sublinaje LAM2 y el huérfano MEX224 de linaje desconocido, resistentes a INH, presentaron mutaciones en los genes *inhA* o *katG*. Los SIT137 del sublinaje X2 y SIT469 del sublinaje LAM9, ambos MFR, presentaron mutación en *rpoB*. SIT406 del linaje Beijing, MFR, presentó mutaciones en tanto en *inhA* como en *rpoB* (Tabla 11).

TABLA 11. SIT y linajes con mutaciones asociadas a farmacorresistencia encontrados en este estudio.

Aislamiento	SIT	Linaje	Resistencia	Mutaciones
MEX277	34	S	INH	<i>inhA</i>
MEX169	51	T1	INH	<i>katG</i>
MEX171	53	T1	INH	<i>katG</i>
MEX318	137	X2	MFR	<i>rpoB</i>
MEX117	406	Beijing	MFR	<i>inhA, rpoB</i>
MEX18	469	LAM9	MFR	<i>rpoB</i>
MEX111	732	T1	INH	<i>katG</i>
MEX220	1215	LAM2	INH	<i>inhA</i>
MEX224	Huérfano	Unk	INH	<i>katG</i>

SIT: *Shared International Type*; INH: isoniazida; MFR: Multifarmacorresistente.

6. DISCUSIÓN

La farmacorresistencia en *M. tuberculosis* es un problema de salud pública serio, especialmente en países en desarrollo. Para poder contribuir en la solución del problema, es necesario que se lleve a cabo la vigilancia de patrones de resistencia y las mutaciones asociadas a esta resistencia. Por ello, en este trabajo se describe la resistencia fenotípica a los antifímicos de primera línea y las mutaciones en genes asociados a resistencia a INH y RIF en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de Guadalajara, Jalisco. Escasos estudios en el país han analizado la frecuencia de mutaciones en genes asociados a farmacorresistencia de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (85, 97, 104, 106-111). De hecho, este es el primer análisis de mutaciones asociadas a resistencia a INH y RIF de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de Guadalajara, Jalisco.

La farmacorresistencia y MFR en México que se reportó en una revisión en 2009 fue de 33% y 17%, respectivamente (103). En el presente trabajo, se observó que la farmacorresistencia de aislamientos de Guadalajara, Jalisco, fue más alta (48.6%) y la MFR no varió mucho (17.1%). El único reporte de farmacorresistencia en Jalisco fue en el año 2000. En ese estudio, 237 aislamientos clínicos fueron analizados y la MFR detectada fue de 38%. Como puede notarse, este valor es más alto que el valor que se detectó en el presente estudio, en el cual se analizaron 105 aislamientos, lo cual sugiere que la tasa de MFR puede ir disminuyendo en el lapso de doce años (89). Sin embargo, es de considerarse que en el presente estudio sólo se analizaron muestras de pacientes

con sospecha de TB, así que el valor real de la población de Guadalajara podría ser distinto.

En general, los resultados de los métodos de MGIT y de proporciones mostraron patrones de resistencia similar y fuerte concordancia. No obstante, el método de MGIT mostró mejores resultados cuando se analizó la resistencia a INH y EMB, puesto que casi el doble de aislamientos resistentes a INH se detectó por el método de MGIT, a comparación del método de proporciones. Entre los 13 aislamientos susceptibles por el método de proporciones y resistentes por el método MGIT, tres tenían una mutación en *katG*, dos tenían una mutación en *inhA* y tres tenían una mutación en *ahpC*. Lo anterior parece indicar que estos aislamientos son en realidad resistentes. Por lo tanto, cuando se realice análisis de susceptibilidad a INH por el método de proporciones, se deben analizar además las mutaciones en genes asociados a resistencia.

Los resultados en el presente trabajo mostraron que ambos métodos tuvieron resultados similares cuando se detectaron aislamientos MFR (19% y 17.1% para el método de MGIT y de proporciones, respectivamente), por lo tanto, ambos métodos aún son confiables. De forma similar, Abe *et al.* encontraron que el método MGIT mostró mejor desempeño que el método de proporciones para determinar la resistencia a INH (167) y sus resultados fueron confirmados mediante el análisis de los genes *katG* e *inhA*. Tanto los resultados de Abe *et al.* y los resultados presentados en el presente trabajo sugieren que el método MGIT es acertado para la determinación rápida de susceptibilidad de *M. tuberculosis*.

Las mutaciones en el RRDR (Región Determinante de Resistencia a Rifampicina) del gen *rpoB* son las más asociadas a resistencia a RIF, incluso en un 95% (45, 46). En este estudio, sólo se encontró la mutación *Ser531Leu*, en casi la mitad de los

aislamientos resistentes a RIF (48%). De hecho, esta es la mutación que más frecuentemente se detecta en los aislamientos resistentes a RIF a nivel mundial (168-170) y en el presente trabajo se detectó en menor frecuencia que en otros países, como China (59.2%) (171), Italia (56.7%) (168), Turquía (56.7%) (169), Siria (56.5%) (172) e India (54.5%) (173).

De igual forma la mutación *rpoB531* ha sido reportada en varios estados del país, como Nuevo León (28.6-54.4%) (97, 108, 109), Veracruz (33.3%) (104, 111), Distrito Federal (12.5-28.6%) (85, 104, 106, 107), Distrito Federal/Puebla/Veracruz (35.9%) (104), Sonora (30.8%) (110) y Durango (14.3%) (106). La frecuencia de la mutación *rpoB531* encontrada en el presente trabajo es superior a la mayoría encontrada en otros estados. Otras mutaciones comúnmente asociadas a resistencia a RIF que no se detectaron en el presente trabajo son *rpoB516* y *rpoB526* (97, 106-108, 110).

Es importante considerar que en el presente estudio no se analizó la RRDR completa, que abarca de los codones 507 al 533 (45, 46); y se han reportado mutaciones fuera de la RRDR en aislamientos resistentes a RIF alrededor del mundo (113), incluyendo México (104, 107, 111); por lo tanto, es posible que los aislamientos resistentes a RIF que no se encontraron mutados en la región analizada en este estudio (codones 515 al 533) puedan tener mutaciones en los codones 509-513 (104, 106, 107, 111) o incluso fuera de la RRDR.

Se ha demostrado que casi todos los aislamientos resistentes a RIF también presentan resistencia a otros antifímicos, principalmente a INH (174). De hecho, la detección de resistencia a RIF se ha propuesto como un indicador temprano de TB MFR. Los resultados del presente trabajo muestran que casi todos los aislamientos resistentes a RIF analizados (95%) también fueron resistentes a INH. Para poder delinear este rol, se

necesitan analizar más aislamientos clínicos para determinar si el gen *rpoB* puede ser usado como un marcador alternativo para detectar tempranamente la presencia de TB MFR.

La mutación *Ser315Thr* del gen *katG* es la más frecuentemente asociada a resistencia a INH (45, 46). En el presente estudio se encontró baja frecuencia de mutaciones *katG* en aislamientos resistentes a INH (14%), muy por debajo de la frecuencia encontrada en otros países como China (55.2%) (175), India (64.3%) (176), Brazil (69.3-80.2%) (53, 177), Estados Unidos (75%) (178), Vietnam (76.8%) (179), Bangladés (83.9%) (180), Etiopía (94.3%) (181) y Rusia (95%) (182). Esta mutación también se ha reportado en nuestro país en el Distrito Federal (100%) (85), Nuevo León (35.7-64.9%) (92, 108, 109), Veracruz (52.9) (111) y Sonora (42.9) (110), con frecuencias mucho más altas que la encontrada en el presente estudio, sin embargo, no se buscaron otras mutaciones menos comunes como son en los codones 249 (109), 271 (92), 275, 307 (109), 311 (109, 111), 318, 328, 331 (111), 727 (111) y deleciones en codones 29-353 (109), los cuales han sido reportados en otros estados de México.

Se encontró una frecuencia de mutaciones del 26% en la región promotora de *inhA* similar a lo que se ha reportado anteriormente, que es entre el 20 al 34% de los aislamientos resistentes a INH (45, 46). En otros países, se han encontrado frecuencias más bajas como en Etiopía (5.7%) (181), India (11.4%) (176), China (15%) (175), Lituania (19.2%) (183), España (23.6%) (184), y frecuencias más altas que la encontrada en el presente trabajo, como Inglaterra (27.2%) (185) y Siria (32%) (172). Hasta ahora, sólo tres estudios han reportado mutaciones en este gen en México donde se detectó la misma mutación que en el presente estudio (C → T, -15). Garza-Gonzalez *et al.*

detectaron solo dos aislamientos con esta mutación, uno susceptible y otro resistente a INH en el estado de Tamaulipas (7.7%) (97). Ramaswamy *et al.* detectaron tres aislamientos resistentes a INH con esta mutación en Nuevo León (8.1%) (109) y Bolado-Martínez *et al.* encontraron cinco aislamientos resistentes a INH mutados en este gen, al igual que un aislamiento susceptible Sonora (28.6%) (110). En el presente estudio no se encontró ningún aislamiento susceptible a INH con esta mutación.

Hazbon *et al.* encontraron diferente distribución de mutaciones asociadas a resistencia a INH en aislamientos monorresistentes y MFR: las mutaciones en el promotor de *inhA* fueron más frecuentes en aislamientos monorresistentes a INH y las mutaciones en el gen *katG* fueron más comunes en aislamientos MFR (105). En el presente trabajo se encontraron resultados diferentes: todos los aislamientos que presentaron mutaciones en *katG* fueron monorresistentes y el 72.7% de los aislamientos que presentaron mutaciones en *inhA* fueron MFR.

Interesantemente, el 48% de los aislamientos resistentes a INH en este estudio no presentaron ninguna mutación de las analizadas. Es posible que otros genes puedan estar involucrados, puesto que se ha reportado que mutaciones en *ndh* (NADH deshidrogenasa) se han encontrado en aislamientos resistentes a INH sin presentar mutaciones en *katG*, *inhA* y *ahpC* (52). Sin embargo, es necesario expandir el análisis de las regiones de *katG* e *inhA*, antes de considerar el análisis de otros genes.

Interesantemente, en este estudio se detectaron tanto aislamientos susceptibles (29%) como resistentes (26%) mutados en el gen *ahpC*. En México sólo otros dos estudios han reportado mutaciones en *ahpC* en 3.1-9.4% de aislamientos resistentes a INH (97, 110).

En *M. tuberculosis*, *ahpC* codifica para una alquil hidropoxidasa reductasa que está implicada en la resistencia a los intermediarios del oxígeno y nitrógeno reactivo. Este gen se ha asociado a resistencia a INH (50, 113); sin embargo, se ha encontrado que un incremento en la expresión de *ahpC* parece ser más una mutación que compensa la pérdida de actividad de catalasa/peroxidasa que la base de la resistencia a INH (45, 57). De hecho, la misma mutación que se encontró con más frecuencia en el presente trabajo (C→T, -15), se ha encontrado junto con una delección del gen *katG*, y es posible que las mutaciones en la región promotora de *ahpC* sí son compensatorias, en lugar de causar resistencia directamente (186). No obstante, en el presente estudio no se encontró ninguna delección de *katG*.

Dalla Costa *et al.* encontraron mutaciones en la region intergénica de *oxyR-ahpC* en 8.9% de 224 aislamientos resistentes a INH estudiados, confirmando su poca participación como causa de resistencia a INH (187). Garza-Gonzalez *et al.* encontraron un aislamiento susceptible con una mutación en la posición -32 de *ahpC* (97). Además, Ong *et al.* también encontraron un aislamiento susceptible con una mutación C→ T, -15 en *ahpC* (188). Consecuentemente, sugieren que esta alteración en la secuencia puede ser un polimorfismo. Los resultados en el presente estudio fuertemente soportan esta hipótesis.

Aunque se encontraron 23 (21.9%) aislamientos resistentes a EMB, no se realizó análisis del gen *embB*, el cual se ha asociado a esta resistencia hasta en un 65% (61). De hecho, de los 23 aislamientos resistentes a EMB en este estudio, 14 (60.9%) también fueron MFR. Sería conveniente entonces realizar análisis de los genes *embB* de estos aislamientos para corroborar los resultados encontrados en este estudio (65), o en otro

estudio realizado en Nuevo León, donde se encontraron mutaciones en los codones 306 y 406 de este gen en aislamientos resistentes (109). De igual forma, no se realizó el análisis de los genes *rrs* y *rpsL* en los 28 (26.7%) aislamientos resistentes a STR, de los cuales 13 (46.4%) fueron MFR.

En México, existen pocos estudios que han analizado la frecuencia de mutaciones asociadas a FR en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* en el Distrito Federal (65, 85, 104-107), Durango (106), Nuevo León (97, 108, 109), Puebla (65, 104, 105), Sonora (110), Tamaulipas (97) y Veracruz (65, 104, 105, 111, 112). En varios estudios fueron identificadas algunas mutaciones que no habían sido reportadas previamente (85, 104, 107, 113). No obstante, a pesar de que Jalisco es uno de los estados mexicanos que aún no había sido analizado, en este estudio no se detectó ninguna nueva mutación. Estudios adicionales ayudarían a revelar la distribución de las mutaciones asociadas a farmacorresistencia en nuestro país.

El análisis de la diversidad genética de las cepas de *M. tuberculosis* permite determinar los distintos genotipos responsables de causar TB en diferentes lugares, lo cual es importante para el control de esta enfermedad. Se ha reportado la contribución de la variación genética de las cepas de *M. tuberculosis* en la variación de la presentación de la enfermedad, frecuencia de la transmisión y la respuesta del tratamiento (189, 190).

Particularmente, se ha reportado la asociación de cepas de *M. tuberculosis* del genotipo Beijing con MFR y alta habilidad de transmitir y causar enfermedad (156, 157).

El genotipo Beijing se identifica principalmente por la delección de los espaciadores 1-34, la delección de RD207 y la presencia de al menos tres de los nueve espaciadores en el locus DR (121, 191, 192). A la fecha, se han reportado 27 tipos

compartidos de la familia Beijing en la base internacional SITVIT2 (incluyendo un total de 6,148 cepas de 71 países de origen).

El genotipo Beijing clásico se caracteriza por el SIT1 en el SITVIT2 (a la fecha de esta comparación, SITVIT2 contenía un total de 5,800 cepas SIT1 representando el 94.3% de todas las cepas Beijing). Aunque estas cepas son altamente prevalentes en Asia, tienen una distribución geográfica mundial (158). De igual forma, el genotipo SIT1 ha sido reportado en varios estados de México, tal como Puebla (153), Jalisco (79), Baja California, Sinaloa, Veracruz (154) y San Luis Potosí (155), tanto en cepas farmacorresistentes como susceptibles.

Sin embargo, en este estudio se detectó un aislamiento MFR con un patrón SIT406, correspondiente a un genotipo Beijing. Este es el primer reporte de SIT406 Beijing no sólo en nuestro país sino en Latinoamérica. A la fecha de esta comparación, SIT406 representó un total de 14 cepas en la base de datos SITVIT2, es decir, sólo el 0.2% de las cepas Beijing *sensus stricto* (SIT1, $n=5,800$). La distribución mundial de las cepas SIT406 se limitó esencialmente a Estados Unidos (64.3%), Bélgica (7.1%), India (7.1%), Italia (7.1%), Japón (7.1%) y Túnez (7.1%).

Poco se conoce respecto a la enfermedad causada por los genotipos Beijing raros que difieren del genotipo Beijing clásico por su patrón de spoligotipo. De hecho, en Latinoamérica se han detectado sólo dos casos de cepas Beijing raras en México (SIT269 y SIT941) (135) y reporte de caso de Colombia (SIT190) (193). No obstante, el spoligotyping se ha usado en su mayoría en países de alto ingreso económico, y debido a la información incompleta de spoligotyping en países tales como México, la contribución real de Beijing y otros genotipos no está clara.

El fracaso del tratamiento anti-tuberculoso ha sido asociado con MFR en lugar del genotipo Beijing (194). Sin embargo, considerando que la mayoría de las cepas Beijing detectadas a nivel mundial pertenecen al SIT1, el estudio de diferentes genotipos pertenecientes a la familia Beijing puede mostrar diferentes resultados.

Los linajes más predominantes que se encontraron en Guadalajara fueron el Haarlem, el Latinoamérica-Mediterráneo, el X y el T. Estos resultados son similares a los reportados en varios estudios en varios estados del país (79, 83, 85, 90, 92, 152-155). Se detectó predominancia de SIT53, SIT50 y SIT42, como se ha reportado anteriormente (79, 83, 92, 152, 154).

Se detectó alto índice de agrupación de spoligotipos (69%), como se ha reportado repetidamente en México (79, 85, 92, 152). Esto indica alta transmisión de clonas de *M. tuberculosis*. La mayoría de los aislamientos agrupados, independientemente de la familia genotípica, fueron susceptibles a fármacos, indicando baja transmisión de aislamientos FR.

Aunque se ha detectado un alto número de spoligotipos no reportados previamente en la base de datos internacional en otros estudios (85, 152), en el presente estudio sólo el 7.3% de los aislamientos no se habían reportado anteriormente en la base de datos.

Los SIT34 del sublinaje S, SIT51, SIT53 y SIT732 del sublinaje T1, SIT1215 del sublinaje LAM2 y el huérfano MEX224 de linaje desconocido, resistentes a INH, presentaron mutaciones en los genes *inhA* o *katG*. SIT137 (X2) y SIT469 (LAM9), ambos MFR, presentaron mutación en *rpoB*. SIT406 (Beijing), MFR, presentó mutaciones tanto en *inhA* como en *rpoB*.

Las mutaciones específicas asociadas a FR en cepas de *M. tuberculosis* se han detectado en familias genéticas específicas, tales como Beijing y LAM (182, 187). Además, se han detectado cepas MFR (SIT53, T1) con bajo número de copias de IS6110 con prevalencia de mutaciones *katG315*, *rpoB526* y *rpoB531* (92). Sin embargo, en la mayoría de los estudios realizados en México, no se ha encontrado correlación entre los patrones genotípicos o clústers de diferentes cepas y mutaciones específicas (85, 104, 109). En el presente estudio, la frecuencia de mutaciones de aislamientos de una misma familia fue muy baja, lo que sugiere que los aislamientos estudiados no están relacionados genéticamente y por tanto las mutaciones se adquirieron independientemente.

La comprensión de la naturaleza y frecuencia de mutaciones asociadas a FR en *M. tuberculosis*, al igual que el discernimiento del genotipo específico causando infección en diferentes lugares es importante para el control de la enfermedad. La alarmante escasez de genotipificación de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de México, resalta la necesidad de nuevos estudios que puedan generar más información de los genotipos actuales. Algunos genotipos Beijing han sido asociados a MFR (157), y dado que esta FR y las mutaciones asociadas a ésta se han estado incrementando en los últimos años, la búsqueda de este genotipo debe realizarse para determinar si también se ha estado expandiendo.

Teniendo en consideración que el índice de TB en el país no ha disminuido considerablemente en los últimos años, se necesitan más estudios para poder evaluar mejor la dinámica de la transmisión de *M. tuberculosis* y cepas de *M. tuberculosis* farmacorresistentes.

7. CONCLUSIONES

- ❖ Se detectaron altos niveles de farmacorresistencia (48.6%) y multifarmacorresistencia (19%) en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de Jalisco.
- ❖ Se detectaron mutaciones asociadas a farmacorresistencia comúnmente reportadas mundialmente en los genes *rpoB* (48%), *katG* (14%), *inhA* (26%) y *ahpC* (26%).
- ❖ Se encontró un posible polimorfismo en aislamientos susceptibles a isoniazida en el gen *ahpC* (29%).
- ❖ La mayor frecuencia de agrupación (69.2%) se presentó en SIT53 (25%), SIT50 (8.8%), SIT42 (7.4%), SIT1231 (5.9%) y SIT137 (4.4%).
- ❖ Los linajes predominantes fueron T, Haarlem y LAM, como se ha reportado anteriormente.
- ❖ La transmisión de cepas multifarmacorresistencia detectada fue baja (agrupación de 12.8%).
- ❖ Se detectó por primera vez en Latinoamérica un genotipo Beijing raro, SIT406, con un fenotipo multifarmacorresistente.

8. REFERENCIAS

1. Barksdale L, Kim KS. *Mycobacterium*. *Bacteriol Rev*. 1977;41(1):217-372.
2. Runyon EH. Source of scotochromogens. *American Review of Respiratory Disease*. 1959;80:277-8.
3. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2007.
4. Palmer MV. Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2007;315:195-215.
5. Brosman SA. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. Techniques and results. *Urol Clin North Am*. 1992;19(3):557-64.
6. Niemann S, Rusch-Gerdes S, Joloba ML, Whalen CC, Guwatudde D, Ellner JJ *et al*. *Mycobacterium africanum* subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3398-405.
7. Niemann S, Kubica T, Bange FC, Adjei O, Browne EN, Chinbuah M *et al*. The species *Mycobacterium africanum* in the light of new molecular markers. *J Clin Microbiol*. 2004;42(9):3958-62.
8. van Soolingen D, van der Zanden AG, de Haas PE, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraine NA *et al*. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol*. 1998;36(7):1840-5.
9. van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS *et al*. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*. 1997;47(4):1236-45.
10. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S *et al*. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(Pt 5):1305-14.
11. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Dominguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al*. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(Pt 6):1785-9.
12. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM *et al*. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(8):1296-1299.
13. Mitchison DA. Bacteriological aspects of mycobacterial infections. *Br Med J*. 1972;1(5797):424-25.
14. Cole ST, 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(6685):537-44.
15. Brosch R, Gordon SV, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Soravito C *et al*. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infection and Immunity*. 1998;66(5):2221-9.
16. Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1637-50.

17. Nakajima C, Rahim Z, Fukushima Y, Sugawara I, van der Zanden AG, Tamaru A *et al.* Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Bangladesh by a species distinguishable multiplex PCR. *BMC Infect Dis.* 2010;10:118.
18. Albino JA, Reichman LB. The treatment of tuberculosis. *Respiration.* 1998;65(4):237-55.
19. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2012. Geneva, Suiza.
20. Secretaría de Salud. Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, Mexico, 2012; Disponible en: http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/2012/Monografias_5_Tuberculosis_Mex_junio12.pdf. Noviembre 2012.
21. Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity.* 1998;66(4):1277-81.
22. Ehlers MR, Daffe M. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol.* 1998;6(8):328-35.
23. Kaufmann SHE, Hahn H. Mycobacteria and TB. Basel; New York: Karger; 2003: 155.
24. Grzybowski S, Barnett GD, Styblo K. Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc.* 1975;50(1):90-106.
25. Harisinghani MG, McCloud TC, Shepard JA, Ko JP, Shroff MM, Mueller PR. Tuberculosis from head to toe. *Radiographics.* 2000;20(2):449-470; quiz 528-449, 532.
26. Calpe JL, Chiner E, Larramendi CH. Endobronchial tuberculosis in HIV-infected patients. *AIDS.* 1995;9(10):1159-64.
27. Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease.* 1980;121(6):939-49.
28. Mitchison DA. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle.* 1985;66(3):219-25.
29. Mitchison DA. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest.* 1979;76(6 Suppl):771-81.
30. Wolinsky E, Reginster A, Steenken W, Jr. Drug-resistant tubercle bacilli in patients under treatment with streptomycin. *Am Rev Tuberc.* 1948;58(3):335-43.
31. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):496-514.
32. Mitchison DA. Drug resistance in tuberculosis. *Eur Respir J.* 2005;25(2):376-79.
33. Frieden TR, Sterling T, Pablos-Mendez A, Kilburn JO, Cauthen GM, Dooley SW. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med.* 1993;328(8):521-26.
34. Giedraitiene A, Vitkauskiene A, Naginiene R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas).* 2011;47(3):137-46.
35. Shimao T. Drug resistance in tuberculosis control. *Tubercle.* 1987;68(2 Suppl):5-18.
36. Vareldzis BP, Grosset J, de Kantor I, Crofton J, Laszlo A, Felten M *et al.* Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. *Tuber Lung Dis.* 1994;75(1):1-7.
37. Mitchison DA. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2(1):10-15.

38. Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, Williams J, Sordillo EM *et al.* An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1992;326(23):1514-21.
39. Kubin M, Havelkova M, Hyncicova I, Svecova Z, Kaustova J, Kremer K *et al.* A multidrug-resistant tuberculosis microepidemic caused by genetically closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2715-16.
40. Bandera A, Gori A, Catozzi L, Degli Esposti A, Marchetti G, Molteni C *et al.* Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2001;39(6):2213-18.
41. Secretaría de Salud. MDR-TB. *Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud Cd Mexico, Mexico.* 2007;Tuberculosis:1. CENA VECE/OPS-OMS/CONAVE/INER/InDRE.
42. Dooley SW, Jarvis WR, Martone WJ, Snider DE, Jr. Multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med.* 1992;117(3):257-59.
43. Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, Ziazarifi AH *et al.* Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. *Chest.* 2009;136(2):420-25.
44. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D *et al.* Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet.* 2010;375(9728):1830-43.
45. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 1998;79(1):3-29.
46. 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.
47. Riska PF, Jacobs WR, Jr., Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4(2 Suppl 1):S4-10.
48. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature.* 1992;358(6387):591-93.
49. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T *et al.* *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 1994;263(5144):227-30.
50. Wilson TM, Collins DM. *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol Microbiol.* 1996;19(5):1025-34.
51. Mdluli K, Slayden RA, Zhu Y, Ramaswamy S, Pan X, Mead D *et al.* Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science.* 1998;280(5369):1607-10.
52. Lee AS, Teo AS, Wong SY. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):2157-59.
53. Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO, Valim AR, Telles MA, Kritski A *et al.* Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4471-74.

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. Vilcheze C, Jacobs WR, Jr. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:35-50.
56. Leung ET, Ho PL, Yuen KY, Woo WL, Lam TH, Kao RY *et al.* Molecular characterization of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a novel mutation in *inhA*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(3):1075-78.
57. Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE, 3rd *et al.* Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 1996;272(5268):1641-43.
58. Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, Banerjee A, Schurra C, Jacobs WR, Jr. *et al.* Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet.* 1994;344(8918):293-8.
59. Telenti A, Honore N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B *et al.* Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J Clin Microbiol.* 1997;35(3):719-23.
60. Rinder H, Thomschke A, Rusch-Gerdes S, Bretzel G, Feldmann K, Rifai M *et al.* Significance of *ahpC* promoter mutations for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998;17(7):508-11.
61. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B *et al.* The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med.* 1997;3(5):567-70.
62. Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR, Jr. *et al.* Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(8):1677-81.
63. Ramaswamy SV, Amin AG, Goksel S, Stager CE, Dou SJ, El Sahly H *et al.* Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(2):326-36.
64. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):3810-3.
65. Hazbon MH, Bobadilla del Valle M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Filliol I, Cavatore M *et al.* Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(9):3794-802.
66. Plinke C, Cox HS, Kalon S, Doshetov D, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Tuberculosis ethambutol resistance: concordance between phenotypic and genotypic test results. *Tuberculosis (Edinb).* 2009;89(6):448-52.
67. Blanchard JS. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:215-39.

68. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ *et al.* Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993;341(8846):647-50.
69. Heep M, Brandstatter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Rusch-Gerdes S *et al.* Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):107-10.
70. 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):1075-77.
71. Honore N, Cole ST. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(2):238-42.
72. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA *et al.* Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ*. 1969;41(1):21-43.
73. Walters SB, Hanna BA. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by mycobacterium growth indicator tube method. *J Clin Microbiol*. 1996;34(6):1565-7.
74. Herrera M, Blancarte QF, Anzaldo QF, Campos PQ, Senties R. Primary resistance in 126 cases of pulmonary tuberculosis. *Salud Publica Mex*. 1976;18(1):111-4.
75. Blancarte L, Anzaldo de Jaime G, Balandrano S. Primary resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Salud Publica Mex*. 1982;24(3):321-7.
76. Peter CR, Schultz E, Moser K, Cox M, Freeman R, Ramirez-Zetina M *et al.* Drug-resistant pulmonary tuberculosis in the Baja California-San Diego County border population. *West J Med*. 1998;169(4):208-13.
77. Granich RM, Balandrano S, Santaella AJ, Binkin NJ, Castro KG, Marquez-Fiol A *et al.* Survey of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican states, 1997. *Arch Intern Med*. 2000;160(5):639-44.
78. Laniado-Laborin R. Tratamiento acertado estrictamente supervisado: Estrategia necesaria, pero no suficiente para controlar la tuberculosis en Baja California, México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2000;13:23-7.
79. Macias-Parra M, Kumate Rodriguez J, Arredondo Garcia JL, Lopez-Vidal Y, Castanon-Arreola M, Balandrano S *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Complex Genotype Diversity and Drug Resistance Profiles in a Pediatric Population in Mexico. *Tuberc Res Treat*. 2011;2011:239042.
80. Bojorquez I, Barnes RF, Flood J, Lopez-Gatell H, Garfein RS, Backer CE *et al.* Multidrug-Resistant Tuberculosis Among Patients in Baja California, Mexico, and Hispanic Patients in California. *American Journal of Public Health*. 2013;103(7):1301-5.
81. Alvarez-Gordillo GC, Halperin-Frisch D, Blancarte-Melendres L, Vazquez-Castellanos JL. Risk factors for antitubercular drug resistance in Chiapas, Mexico. *Salud Publica Mex*. 1995;37(5):408-16.
82. Bernal-Alvarado KS HN, Pizarro-Chavez S, Grimaldo-Zuñiga N, Rivera-Chavira BE. Frecuencia de resistencia primaria de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes de la ciudad de Chihuahua. *RESPYN*. 2002;5.

83. Quitugua TN, Seaworth BJ, Weis SE, Taylor JP, Gillette JS, Rosas, II *et al.* Transmission of drug-resistant tuberculosis in Texas and Mexico. *J Clin Microbiol.* 2002;40(8):2716-24.
84. Velasco-Rodriguez VM P-GA, Esquivel-Molina C, Sanchez-Cabral O, Martinez-Ordaz V, Cicero-Sabido R. Epidemiología y resistencia primaria a farmacos en casos incidentes de tuberculosis pulmonar. *Rev Med IMSS* 2004;42:301-6.
85. Lopez-Alvarez R, Badillo-Lopez C, Cerna-Cortes JF, Castillo-Ramirez I, Rivera-Gutierrez S, Helguera-Repetto AC *et al.* First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance. *BMC Microbiol.* 2010;10:82.
86. Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-Leon LA, Camacho-Mezquita FE, Bobadilla-del-Valle JM, Infante-Suarez ML, Ramirez-Fernandez N *et al.* Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican patients. I. Clinical features and risk factors. *Rev Invest Clin.* 1995;47(4):273-81.
87. Olvera-Castillo R. Farmacorresistencia secundaria en tuberculosis. Tendencia en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2001;14:151-9.
88. Salazar-Lezama MA, Valdez-Vazquez RR, Lopez-Segundo E, Villareal-Velarde H, Quiñonez-Falconi F, Baez-Saldaña R. Resultados de Tratamiento de Tuberculosis Resistente en 91 Pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias: 2001-2003. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004;17:15-21.
89. Amaya-Tapia G, Martin-Del Campo L, Aguirre-Avalos G, Portillo-Gomez L, Covarrubias-Pinedo A, Aguilar-Benavides S. Primary and acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Mexico. *Microb Drug Resist.* 2000;6(2):143-5.
90. Yang ZH, Rendon A, Flores A, Medina R, Ijaz K, Llaca J *et al.* A clinic-based molecular epidemiologic study of tuberculosis in Monterrey, Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5(4):313-20.
91. Said-Fernandez S C-OG, Becerril-Montes P, Navarro-Marmolejo L, Valdovinos-Chavez S. Perfiles de resistencia a medicamentos antituberculosos de primera y segunda elección en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de enfermos con tuberculosis pulmonar radicados en el sector noroeste de la ciudad de Monterrey y atendidos por el IMSS. *RESPYN.* 2001;4.
92. Molina-Torres CA, Moreno-Torres E, Ocampo-Candiani J, Rendon A, Blackwood K, Kremer K *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. *J Clin Microbiol.* 2010;48(2):448-55.
93. Becerril-Montes P, Said-Fernandez S, Luna-Herrera J, Caballero-Olin G, Enciso-Moreno JA, Martinez-Rodriguez HG *et al.* A population-based study of first and second-line drug-resistant tuberculosis in a high-burden area of the Mexico/United States border. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(2):160-6.
94. Frago Morales LE, Pastor Durango P, Magana Aquino M, Fajardo Santana H, Bobadilla de Valle M, Carrera de la Torre B *et al.* Risk factors for drug-resistant tuberculosis in San Luis Potosi, Mexico 2003-2004. *Salud Publica Mex.* 2006;48(5):361-2.
95. Zazueta-Beltran J, Muro-Amador S, Flores-Gaxiola A, Llausas-Magana E, Leon-Sicairos N, Canizalez-Roman A. High rates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sinaloa State, Mexico. *J Infect.* 2007;54(4):411-2.

96. Martinez-Medina MA. Effect of shortened directly observed treatment on compliance and cure rate of pulmonary tuberculosis. *Gac Med Mex.* 2004;140(1):1-6.
97. Garza-Gonzalez E, Gonzalez GM, Renteria A, Cruz-Pulido W, Rivera G, Bocanegra-Garcia V. A pyrosequencing method for molecular monitoring of regions in the *inhA*, *ahpC* and *rpoB* genes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(6):607-12.
98. Garcia-Garcia ML, Ponce de Leon A, Jimenez-Corona ME, Jimenez-Corona A, Palacios-Martinez M, Balandrano-Campos S *et al.* Clinical consequences and transmissibility of drug-resistant tuberculosis in southern Mexico. *Arch Intern Med.* 2000;160(5):630-6.
99. Garcia-Garcia ML, Jimenez-Corona ME, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona A, Palacios-Martinez M, Balandrano-Campos S *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in a suburban community in southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4(12 Suppl 2):S168-70.
100. Garcia-Garcia ML, Sifuentes-Osornio J, Jimenez-Corona ME, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona A, Bobadilla-del Valle M *et al.* Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Orizaba, Veracruz. Implications for the tuberculosis prevention and control program. *Rev Invest Clin.* 2001;53(4):315-23.
101. Ponce-De-Leon A, Garcia-Garcia Md Mde L, Garcia-Sancho MC, Gomez-Perez FJ, Valdespino-Gomez JL, Olaiz-Fernandez G *et al.* Tuberculosis and diabetes in southern Mexico. *Diabetes Care.* 2004;27(7):1584-90.
102. Zenteno-Cuevas R, Rubi A, Fuentes-Dominguez J, Lara-Gonzalez JL, Escobar-Mesa A. Dynamics of multidrug resistant tuberculosis in Veracruz, Mexico between 2002 and 2008. *J Infect Dev Ctries.* 2010;4(11):776-8.
103. Zazueta-Beltran J, Leon-Sicairos C, Canizalez-Roman A. Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J Infect Dev Ctries.* 2009;3(3):162-8.
104. Varma-Basil M, El-Hajj H, Colangeli R, Hazbon MH, Kumar S, Bose M *et al.* Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from India and Mexico by a molecular beacon assay. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5512-6.
105. Hazbon MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M *et al.* Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(8):2640-9.
106. Alvarado-Esquivel C, Rossau R, Martinez-Garcia S, Cisneros-Martinez JA, Mijs W, Nevarez-Najera A *et al.* Characterization of *rpoB* gene mutations in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients at 5 Mexican public hospitals. *Rev Invest Clin.* 2001;53(6):526-30.
107. Bobadilla-del-Valle M, Ponce-de-Leon A, Arenas-Huertero C, Vargas-Alarcon G, Kato-Maeda M, Small PM *et al.* *rpoB* gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(6):1010-3.
108. Viader-Salvado JM, Luna-Aguirre CM, Reyes-Ruiz JM, Valdez-Leal R, del Bosque-Moncayo Mde L, Tijerina-Menchaca R *et al.* Frequency of mutations in *rpoB* and codons 315 and 463 of *katG* in rifampin- and/or isoniazid-resistant

- Mycobacterium tuberculosis* isolates from northeast Mexico. *Microb Drug Resist.* 2003;9(1):33-8.
109. Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, Yang Z, Cave MD, Graviss EA. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 2):107-13.
 110. Bolado-Martinez E, Perez-Mendoza A, Alegria-Morquecho FM, Candia-Plata Mdel C, Aguayo-Verdugo Mdel R, Alvarez-Hernandez G. DNA mutations associated to rifampicin or isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Sonora, Mexico. *Salud Publica Mex.* 2012;54(2):167-70.
 111. Zenteno-Cuevas R, Zenteno JC, Cuellar A, Cuevas B, Sampieri CL, Riviera JE *et al.* Mutations in *rpoB* and *katG* genes in *Mycobacterium* isolates from the Southeast of Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(3):468-72.
 112. Cuevas-Cordoba B, Cuellar-Sanchez A, Pasissi-Crivelli A, Santana-Alvarez CA, Hernandez-Illezcas J, Zenteno-Cuevas R. *rrs* and *rpsL* mutations in streptomycin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013; 46(1):30-4.
 113. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med.* 2009;6(2):e2.
 114. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(4):658-85.
 115. Johnson KR, Braden CR, Cairns KL, Field KW, Colombel AC, Yang Z *et al.* Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from medical waste. *JAMA.* 2000;284(13):1683-8.
 116. Wurtz R, Demarais P, Trainor W, McAuley J, Kocka F, Mosher L *et al.* Specimen contamination in mycobacteriology laboratory detected by pseudo-outbreak of multidrug-resistant tuberculosis: analysis by routine epidemiology and confirmation by molecular technique. *J Clin Microbiol.* 1996;34(4):1017-9.
 117. Burman WJ, Reves RR. Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clinical Infectious Diseases.* 2000;31(6):1390-5.
 118. Small PM, McClenny NB, Singh SP, Schoolnik GK, Tompkins LS, Mickelsen PA. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J Clin Microbiol.* 1993;31(7):1677-82.
 119. van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PE, Sebek MM, Veen J, Dessens M *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis.* 1999;180(3):726-36.
 120. van Rie A, Warren R, Richardson M, Victor TC, Gie RP, Enarson DA *et al.* Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med.* 1999;341(16):1174-9.
 121. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F *et al.* Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol.* 1995;33(12):3234-8.
 122. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W *et al.* Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med.* 1994;330(24):1710-6.

123. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* 1994;235:196-205.
124. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1993;31(8):1987-95.
125. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1991;29(11):2578-86.
126. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, 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.
127. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1990;28(12):2668-73.
128. McAdam RA, Hermans PW, van Soolingen D, Zainuddin ZF, Catty D, van Embden JD *et al.* Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol.* 1990;4(9):1607-13.
129. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B *et al.* IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(1):188.
130. Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J Appl Microbiol.* 2003;94(5):781-91.
131. 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.
132. Warren RM, Streicher EM, Sampson SL, van der Spuy GD, 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.
133. 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;6:23.
134. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C *et al.* Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2607-18.
135. Demay C, Liens B, Burguiere T, Hill V, Couvin D, Millet J *et al.* SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol.* 2012;12(4):755-66.
136. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, van Embden JD. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium*

- tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol.* 1992;30(7):1772-7.
137. Ross BC, Raios K, Jackson K, Dwyer B. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol.* 1992;30(4):942-6.
 138. Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection and Immunity.* 1991;59(8):2695-705.
 139. Wiid IJ, Werely C, Beyers N, Donald P, van Helden PD. Oligonucleotide (GTG)₅ as a marker for *Mycobacterium tuberculosis* strain identification. *J Clin Microbiol.* 1994;32(5):1318-21.
 140. Haas WH, Butler WR, Woodley CL, Crawford JT. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 1993;31(5):1293-8.
 141. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3563-71.
 142. Butler WR, Haas WH, Crawford JT. Automated DNA fingerprinting analysis of *Mycobacterium tuberculosis* using fluorescent detection of PCR products. *J Clin Microbiol.* 1996;34(7):1801-3.
 143. Goulding JN, Stanley J, Saunders N, Arnold C. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1121-6.
 144. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 1998;144 (Pt 5):1189-96.
 145. Sechi LA, Zanetti S, Dupre I, Delogu G, Fadda G. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol.* 1998;36(1):128-32.
 146. Prod'homme G, Guilhot C, Gutierrez MC, Varnerot A, Gicquel B, Vincent V. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by ligation-mediated PCR fingerprint analysis. *J Clin Microbiol.* 1997;35(12):3331-4.
 147. Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson WD, Jr., Riley LW. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 1995;33(5):1383-4.
 148. Otal I, Samper S, Asensio MP, Vitoria MA, Rubio MC, Gomez-Lus R *et al.* Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *J Clin Microbiol.* 1997;35(1):273-7.
 149. Plikaytis BB, Crawford JT, Woodley CL, Butler WR, Eisenach KD, Cave MD *et al.* Rapid, amplification-based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol.* 1993;139(7):1537-42.
 150. Palittapongarnpim P, Chomyc S, Fanning A, Kunimoto D. DNA fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1993;167(4):975-8.

151. Jimenez-Corona ME, Garcia-Garcia L, DeRiemer K, Ferreyra-Reyes L, Bobadilla-del-Valle M, Cano-Arellano B *et al.* Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax*. 2006;61(4):348-53.
152. Nava-Aguilera E, Lopez-Vidal Y, Harris E, Morales-Perez A, Mitchell S, Flores-Moreno M *et al.* Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* cases in Acapulco: Spoligotyping and risk factors. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:408375.
153. Martinez-Gamboa A, Ponce-de-Leon A, Galindo-Fraga A, Bobadilla-del-Valle M, Kato-Maeda M, Robertson BD *et al.* Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains with an intact pks15/1 gene in a rural community of Mexico. *Arch Med Res*. 2008;39(8):809-14.
154. Martinez-Guarneros A, Rastogi N, Couvin D, Escobar-Gutierrez A, Rossi LM, Vazquez-Chacon CA *et al.* Genetic diversity among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Mexico. *Infect Genet Evol*. 2013;14:434-43.
155. Lopez-Rocha E, Juarez-Alvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso-Moreno L, Ortega-Aguilar F, Hernandez-Nieto J *et al.* Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in San Luis Potosi, Mexico. *BMC Res Notes*. 2013;6:172.
156. Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis* 2011;91(6):510-23.
157. Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(2):103-11.
158. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol*. 2002;10(1):45-52.
159. Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline. Document M48-A. CLSI, Wayne, PA2008.
160. Petroff SA. A New and Rapid Method for the Isolation and Cultivation of Tubercle Bacilli Directly from the Sputum and Feces. *J Exp Med*. 1915;21(1):38-42.
161. Belisle JT, Mahaffey SB, Hill PJ. Isolation of mycobacterium species genomic DNA. *Methods Mol Biol*. 2009;465:1-12.
162. Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portaels F. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999;3(4):344-8.
163. Marttila HJ, Soini H, Huovinen P, Viljanen MK. *katG* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Finnish patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(9):2187-9.
164. Caws M, Tho DQ, Duy PM, Lan NT, Hoa DV, Torok ME *et al.* PCR-restriction fragment length polymorphism for rapid, low-cost identification of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):1789-93.
165. Bravo LT, Tuohy MJ, Ang C, Destura RV, Mendoza M, Procop GW *et al.* Pyrosequencing for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to rifampin, isoniazid, and fluoroquinolones. *J Clin Microbiol*. 2009;47(12):3985-90.
166. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(Web Server issue):W326-31.

167. Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, Wada M, Kawabe Y, Takashima T *et al.* Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2263-8.
168. Pozzi G, Meloni M, Iona E, Orru G, Thoresen OF, Ricci ML *et al.* *rpoB* mutations in multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. *J Clin Microbiol.* 1999;37(4):1197-9.
169. 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.
170. Chen L, Gan X, Li N, Wang J, Li K, Zhang H. *rpoB* gene mutation profile in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guizhou, one of the highest incidence rate regions in China. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1299-301.
171. Jiao WW, Mokrousov I, Sun GZ, Li M, Liu JW, Narvskaya O *et al.* Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China. *Chin Med J (Engl).* 2007;120(9):814-9.
172. Madania A, Habous M, Zarzour H, Ghoury I, Hebbo B. Characterization of mutations causing rifampicin and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Syria. *Pol J Microbiol.* 2012;61(1):23-32.
173. Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. *J Clin Microbiol.* 2001;39(8):2987-90.
174. Traore H, Fissette K, Bastian I, Devleeschouwer M, Portaels F. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4(5):481-4.
175. Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ, Jin RL *et al.* Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5477-82.
176. Nusrath Unissa A, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR. Molecular analysis of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(1):71-5.
177. Perizzolo PF, Dalla Costa ER, Ribeiro AW, Spies FS, Ribeiro MO, Dias CF *et al.* Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. *Tuberculosis (Edinb).* 2012;92(1):56-9.
178. Metcalfe JZ, Kim EY, Lin SY, Cattamanchi A, Oh P, Flood J *et al.* Determinants of multidrug-resistant tuberculosis clusters, California, USA, 2004-2007. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(9):1403-9.
179. Minh NN, Van Bac N, Son NT, Lien VT, Ha CH, Cuong NH *et al.* Molecular characteristics of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):598-601.
180. Rahim Z, Nakajima C, Raqib R, Zaman K, Endtz HP, van der Zanden AG *et al.* Molecular mechanism of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from Bangladesh. *Tuberculosis (Edinb).* 2012;92(6):529-34.
181. Tessema B, Beer J, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC. Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2012;12:37.

182. Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, Shinnick TM. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(6):620-6.
183. Bakonyte D, Baranauskaite A, Cicenaitė J, Sosnovskaja A, Stakenas P. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Lithuania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(6):2009-11.
184. Herrera L, Jimenez S, Valverde A, Garcia-Aranda MA, Saez-Nieto JA. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996-2001). Description of new mutations in the *rpoB* gene and review of the literature. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;21(5):403-8.
185. Baker LV, Brown TJ, Maxwell O, Gibson AL, Fang Z, Yates MD *et al.* Molecular analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from England and Wales reveals the phylogenetic significance of the *ahpC* -46A polymorphism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(4):1455-64.
186. Gagneux S, Burgos MV, DeRiemer K, Encisco A, Munoz S, Hopewell PC *et al.* Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos Pathogens.* 2006;2(6):e61.
187. Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI *et al.* Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol.* 2009;9:39.
188. Ong DC, Yam WC, Siu GK, Lee AS. Rapid detection of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1047-54.
189. Aguilar D, Hanekom M, Mata D, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. *Tuberculosis (Edinb).* 2010;90(5):319-25.
190. Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb).* 2011;91(6):510-23.
191. Kremer K, Glynn JR, Lillebaek T, Niemann S, Kurepina NE, Kreiswirth BN *et al.* Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):4040-9.
192. Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, Goguet de la Salmoniere YO, Kreiswirth BN, Van Soolingen D *et al.* Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3185-91.
193. Murcia MI, Manotas M, Jimenez YJ, Hernandez J, Cortes MI, Lopez LE *et al.* First case of multidrug-resistant tuberculosis caused by a rare "Beijing-like" genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Bogota, Colombia. *Infect Genet Evol.* 2010;10(5):678-81.
194. Buu TN, Huyen MN, van Soolingen D, Lan NT, Quy HT, Tiemersma EW *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype does not affect tuberculosis treatment failure in Vietnam. *Clinical Infectious Diseases.* 2010;51(8):879-86.

9. ANEXOS

ANEXO I. Preparación de reactivos

Ácido acético 4M. Diluir 46.5 mL de ácido acético concentrado con 153.5 mL de agua destilada.

Ácido-alcohol. Diluir 3 mL de HCl concentrado en 97 mL de etanol al 95%.

Anilina 4%. Diluir 4 mL de anilina en 100 mL de etanol al 96%.

Azul de bromotimol 0.1%. Diluir 0.1 g de bromotimol en 2 mL de etanol y aforar a 100 mL con agua destilada.

Azul de metileno: Diluir 3 g de azul de metileno en 1 L de agua destilada.

Bromuro de etidio, 0.5 mg/mL (Solución stock). Diluir 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura. Aforar a 50 mL y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

Bromuro de etidio, 2 µg/mL. Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles (1 mL de la solución stock y 249 mL de agua ultrapura). Almacenarse en la oscuridad.

Bromuro de cianógeno 10%. Disolver 2 g de bromuro de cianógeno en 20 mL de agua destilada.

Buffer de alineamiento. Disolver 2.42 g de Tris y 0.43 g de acetato de magnesio tetrahidratado ($C_4H_6MgO_4 \cdot 4H_2O$) en 900 mL de agua destilada, ajustar a pH 7.6 con ácido acético 4 M y aforar a 1 L.

Buffer de lavado (SSC 0.1X, SDS 0.1%). Añadir 5 mL de SSC 20X y 10 mL de SDS 10% a 985 mL de agua destilada.

Buffer de lavado primario (SSC/SDS). Añadir 150 mL de 20X SSC y 10 mL de SDS 10% a 840 mL de agua destilada.

Buffer de lavado primario (Urea). Añadir 360 g de urea y 4 g de SDS a 25 mL de SSC 20X y aforar a 1 L con agua destilada. Preparar justo antes de usarse.

Buffer de lavado secundario (SSC 2X). Diluir SSC 20X 1:10 en agua destilada. Preparar justo antes de usarse.

Buffer de unión. Disolver 1.21 g de Tris, 117 g de NaCl y 0.292 g de EDTA en 900 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.6 con HCl 1M, esterilizar, agregar 1 mL de Tween 20 y aforar a 1 L.

EDTA 20mM: Disolver 7.4 g de EDTA en 1 L y ajustar el pH a 8.

Etanol al 70%. Mezclar 7 volúmenes de etanol absoluto con 3 volúmenes de agua destilada estéril.

Fenol saturado. Fundir 500 g en baño maría, agregar hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1%, ajustar pH a 7.8 con Tris-HCl 500mM pH 8, agitar 24 h en cuarto frío y eliminar la fase acuosa. Repetir con Tris-HCl 100mM pH 8, eliminar fase acuosa y añadir 0.1 volumen de Tris-HCl 100mM pH 8 con β -mercaptoetanol a una concentración de 0.2%.

Fucsina fenicada: Disolver 3 g de fucsina básica y 50 mL fenol en 100 mL de etanol 95%.

Gel de agarosa al 2%. Disolver 4 g de agarosa en 200 mL de TBE 1X, calentar en microondas hasta fundirse, agregar 20 μ L de bromuro de etidio 2 μ g/mL y vaciar en la cámara de electroforesis.

Glutaraldehído al 2%. Disolver 2 g de glutaraldehído en 100 mL de agua destilada.

HCl 1M. Diluir 16.7 mL de HCl concentrado en 183.3 mL de agua destilada.

HCl 50%. Disolver 50 mL de HCl concentrado en 50 mL de agua destilada.

HCl 0.25 M. Diluir 25 mL de HCl 1M en 75 mL de agua destilada.

HCl 3%. Disolver 3 mL de HCl concentrado en 97 mL de agua destilada.

Löwestein-Jensen (medio). Añadir 12.6 g de medio Löwestein-Jensen a 187.5 mL de agua con 3.7 mL de glicerol, calentar hasta hervir, dejar enfriar y añadir 312.5 mL de huevo (gallo-gallina). Vertir 7 mL en tubos con tapón de rosca y cocer por 45 min a 80-85°C por dos días, el primero de ellos, con el tubo inclinado.

Löwestein-Jensen con antifímico. Añadir 12.6 g de medio Löwestein-Jensen a 187.5 mL de agua con 3.7 mL de glicerol, calentar hasta hervir, dejar enfriar y añadir 312.5 mL de huevo (gallo-gallina). Por cada 100 mL agregar del antifímico (1mg/mL): isoniazida, 20 µL; etambutol, 200 µL; estreptomicina, 400 µL y rifampicina 4 mL. Vertir 7 mL en tubos con tapón de rosca y cocer por 45 min a 80-85°C por 1 día, con el tubo inclinado.

***N*-(1-naftil) etilendiamina 0.1%.** Disolver 0.1 g de *N*-(1-naftil) etilendiamina en 100 mL de agua destilada.

NaCl 5M. Disolver 29.2 g de NaCl en 100 mL de agua destilada y esterilizar.

NaOH 4 M. Disolver 160 g de NaOH en 800 mL de agua destilada y aforar a 1 L.

NaOH 0.4 M. Diluir NaOH 4M 1:10 en agua destilada.

NaOH 0.2 M (Solución desnaturalizante). Disolver 8 g de NaOH en 1 L de agua destilada.

NaOH 4%. Disolver 4 g de NaOH en 100 mL de agua destilada.

Proteinasa K (10 mg/mL). Disolver 100 mg de proteinasa K en 10 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7.5.

Lisozima (1mg/mL): Disolver 1 mg de lisozima en 1 mL de agua destilada.

TBE 10X. Disolver 27 g de Tris-base, 13.7 g de ácido bórico, 10 mL de EDTA 0.5 M pH 8 en agua ultrapura y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

TBE 0.5X. Medir 50 mL de TBE 10X y aforar a 1 L con agua destilada.

TE 1X (Tris-HCl mM pH 8, EDTA 1 mM). Mezclar 500 μ L de Tris-HCl 500mM pH=8 y 50 μ L de EDTA 500mM en agua destilada, ajustar el pH a 8 y aforar a 25mL. Esterilizar en autoclave.

TE 1X/SDS 1%. Disolver 1 g de SDS en 100 mL de TE 1X.

Tris-Base pH 7.6 (Buffer de lavado). Disolver 1.21 g de Tris en 900 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.6 con ácido acético 4 M y aforar a 1 L.

Tris-HCl 500 mM. Disolver 30.3 g de Tris base en 300 mL de agua ultrapura, ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 500 mL.

Tris-HCl 100 mM. Diluir 1 volumen de Tris-HCl 500 mM con 4 volúmenes de agua destilada.

Tris-acetato 1.25 M. Disolver 151.4 g de Tris en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 con ácido acético 4 M, aforar a 1 L y esterilizar.

Tris-acetato 0.25 M/NaCl 0.1M. Añadir 200 mL de Tris-acetato 1.25M y 20 mL de NaCl 5M a 780 mL de agua destilada y esterilizar.

Tris-acetato 0.025M/NaCl 0.01M. Diluir 1:10 Tris-acetato 0.25 M/NaCl 0.1M en agua destilada. Preparar antes de usar.

SEVAG: Disolver 1 volumen de alcohol isoamílico en 24 volúmenes de cloroformo.

Solución desnaturalizante: NaCl 1.5 M/NaOH 0.5M.

Solución neutralizante: NaCl 1.5 M/Tris-HCl 0.5M pH 7.5.

Sulfanilamida 0.2%. Disolver 0.2 g de sulfanilamida en 100 mL de agua destilada.

Sustrato amortiguador de nitrato. Disolver 0.085 g de nitrato de sodio (NaNO_3), 0.117 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 0.485 de fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) en 100 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7 y esterilizar.

SSC 20X. Disolver NaCl 3M (175.3 g/L) y citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0.3 M (88.2 g/L) en agua destilada, ajustar el pH a 7 con NaOH 5 M y esterilizar.

SSC 5X. Añadir 1 volumen de SSC 20X con 3 volúmenes de agua destilada.

SSC 2X. Diluir SSC 20X 1:10 en agua destilada. Preparar justo antes de usarse.

SSPE 20X (Solución stock). Mezclar $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 M (35.6 g/L), NaCl 3.6 M (210.24 g/L) y EDTA 20 mM (7.4 g/L). Ajustar el pH a 7.4 y esterilizar.

SDS 10%. Añadir 10 g de SDS a 100 mL de agua destilada.

SDS 1%. Diluir 1:10 SDS 10%.

SSPE 2X. Diluir SSPE 20X 1:10 con agua destilada.

SSPE 2X/SDS 0.1%. Añadir 100 mL de SSPE 20X y 10 mL de SDS 10% a 890 mL de agua destilada.

SSPE 2X/SDS 0.5%. Añadir 100 mL de SSPE 20X y 50 mL de SDS 10% a 850 mL de agua destilada.

ANEXO III. Datos individuales de los aislamientos de *M. tuberculosis* incluidos en este estudio

No.	Espécimen	Fecha	Perfil de Susceptibilidad								Mutaciones asociadas a resistencia	SIT	Linaje	Código octal
			Método de proporciones				Método de MGIT							
			STR	INH	RIF	EMB	STR	INH	RIF	EMB				
G2	Expectoración	08/09/10	S	S	S	S	S	R	S	S	<i>abpC</i> (-15)	34	S	77637777760771
G3	Expectoración	08/09/10	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	1225	S	776377700160771
G5	Expectoración	20/09/10	R	R	R	R	R	R	R	S	<i>inhA</i> (-15), <i>rpoB531</i>	406	Beijing	00000000000731
G6	Expectoración	24/09/10	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	50	H3	77777777720771
G9	Expectoración	24/09/10	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G10	Expectoración	24/09/10	R	R	R	S	R	R	R	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G11	Expectoración	14/10/10	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	50	H3	77777777720771
G18	Expectoración	27/10/10	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>rpoB531</i>	469	LAM9	07777607760771
G20	Expectoración	31/10/10	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	42	LAM9	77777607760771
G22	Expectoración	31/10/10	R	S	S	S	R	S	S	R	Ninguna	535	T1	77777707760771
G23	Expectoración	31/10/10	R	R	S	R	R	R	S	R	Ninguna	19	EAI2-Manila	67777477413771
G24	Expectoración	31/10/10	S	R	R	R	S	R	R	R	<i>inhA</i> (-15), <i>rpoB531</i>	406	Beijing	00000000000731
G29	Ganglio cervical	21/11/10	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G30	Expectoración	21/11/10	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	42	LAM9	77777607760771
G33	Expectoración	27/11/10	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	50	H3	77777777720771
G36	Expectoración	27/11/10	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>inhA</i> (-15), <i>abpC</i> (-15), <i>rpoB531</i>	406	Beijing	00000000000731
G38	Expectoración	04/12/10	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	1356	S	77637777760751
G47	Expectoración	18/12/10	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	Huérfano	Unk	000076360000071
G61	Expectoración	22/01/11	R	R	R	S	R	R	R	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G62	Expectoración	22/01/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G63	Expectoración	29/01/11	R	R	R	R	R	R	R	R	Ninguna	51	T1	77777777760700
G65	Expectoración	29/01/11	R	S	S	S	R	R	S	S	Ninguna	17	LAM2	677737607760771
G66	Expectoración	29/01/11	R	R	S	S	R	R	R	S	Ninguna	2212	H3	77777404720571
G67	Expectoración	05/02/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G73	Expectoración	05/02/11	S	R	S	S	R	R	S	S	Ninguna	1231	T5	77774057760771
G74	Expectoración	05/02/11	S	S	S	R	S	S	S	R	<i>abpC</i> (-15)	53	T1	77777777760771
G75	Expectoración	05/02/11	R	S	S	S	R	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	17	LAM2	677737607760771
G76	Expectoración	05/02/11	S	S	S	S	R	S	S	S	Ninguna	17	LAM2	677737607760771
G77	Expectoración	05/02/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	50	H3	77777777720771
G82	Expectoración	19/02/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	2	H2	00000004020771

ANEXO III. (Continuación)

G83	Expectoración	19/02/11	S	S	S	S	S	R	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G87	Expectoración	26/02/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	50	H3	77777777720771
G88	Expectoración	26/02/11	R	R	S	R	R	R	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G93	Expectoración	05/03/11	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	53	T1	77777777760771
G95	Expectoración	05/03/11	S	S	S	S	S	R	S	S	<i>abpC</i> (-15)	53	T1	77777777760771
G98	Aspirado Bronquial	12/03/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	3000	Unk	774740005720771
G99	Expectoración	23/03/11	S	S	S	S	S	R	S	S	<i>abpC</i> (-15)	53	T1	77777777760771
G103	Expectoración	28/03/11	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	232	Unk	77777760000171
G104	Expectoración	28/03/11	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	3000	Unk	774740005720771
G105	Expectoración	28/03/11	R	R	R	R	R	R	R	R	Ninguna	53	T1	77777777760771
G106	Expectoración	28/03/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G111	Expectoración	04/04/11	S	R	S	S	S	R	S	S	<i>katG315</i>	732	T1	77776377760771
G113	Expectoración	04/04/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	92	X3	70007677760771
G117	Expectoración	09/04/11	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>inhA</i> (-15), <i>abpC</i> (-15), <i>rpoB531</i>	406	Beijing	00000000000731
G120	Aspirado Gástrico	14/04/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	42	LAM9	77777607760771
G121	Expectoración	14/04/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	Huérfano	Unk	000076360000071
G122	Expectoración	14/04/11	S	R	R	R	S	R	R	R	<i>inhA</i> (-15), <i>rpoB531</i>	406	Beijing	00000000000731
G123	Expectoración	07/05/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G124	Expectoración	07/05/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	47	H1	77777774020771
G126	Expectoración	07/06/11	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	47	H1	77777774020771
G127	Expectoración	07/06/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G133	Cepillado bronquial	07/06/11	R	R	R	S	R	R	R	S	Ninguna	1231	T5	77774057760771
G134	Orina	07/06/11	R	R	R	R	R	R	R	R	Ninguna	335	Unk	777767607720771
G136	Expectoración	07/06/11	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	1231	T5	77774057760771
G140	Secreción traqueal	27/06/11	R	R	R	S	R	R	R	S	Ninguna	371	H3	777777007720771
G144	Secreción traqueal	27/06/11	R	R	S	R	R	R	S	R	Ninguna	371	H3	777777007720771
G147	Expectoración	04/07/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G148	Expectoración	04/07/11	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	50	H3	77777777720771
G154	Expectoración	22/07/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G157	Expectoración	05/08/11	S	S	S	S	S	R	S	S	Ninguna	50	H3	77777777720771
G158	Expectoración	05/08/11	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	50	H3	77777777720771
G159	Expectoración	05/08/11	S	S	S	S	S	R	S	S	<i>abpC</i> (-15)	50	H3	77777777720771

ANEXO III. (Continuación)

G162	Traqueostomía	12/08/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	371	H3	77777007720771
G169	Expectoración	02/09/11	S	S	S	S	S	R	S	S	S	<i>katG315</i>	51	T1	77777777760700
G171	Expectoración	02/09/11	S	S	S	S	S	R	S	S	S	<i>katG315</i>	53	T1	77777777760771
G173	Expectoración	10/09/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	20	LAM1	67777607760771
G177	Expectoración	10/09/11	R	S	R	R	R	R	R	R	S	Ninguna	137	X2	77777677760601
G187-A	Expectoración	19/09/11	S	R	S	S	S	R	S	S	S	<i>ahpC (-15), katG315</i>	Huérfano	Unk	77635777760571
G187-C	Expectoración	19/09/11	S	S	S	S	S	R	S	S	S	<i>katG315</i>	Huérfano	Unk	77635777760571
G203	Expectoración	24/09/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	2007	T3	77773767760771
G204	Expectoración	24/09/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	2007	T3	77773767760771
G205	Expectoración	24/09/11	R	S	S	S	R	S	S	S	S	<i>ahpC (-15)</i>	42	LAM9	77777607760771
G206	Expectoración	24/09/11	R	S	S	S	R	S	S	S	S	Ninguna	42	LAM9	77777607760771
G208	Expectoración	24/09/11	R	S	S	S	R	R	S	S	S	Ninguna	42	LAM9	77777607760771
G211	Expectoración	24/09/11	S	R	R	R	S	R	R	R	R	<i>inhA (-15), ahpC (-15), rpoB531</i>	406	Beijing	00000000000731
G214	Expectoración	24/09/11	S	R	R	R	S	R	R	R	R	<i>inhA (-15), ahpC (-15), rpoB531</i>	406	Beijing	00000000000731
G220	Expectoración	24/09/11	S	R	S	S	S	R	S	S	S	<i>inhA (-17)</i>	1215	LAM2	677735607760771
G221	Expectoración	24/09/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>ahpC (-15)</i>	2007	T3	77773767760771
G224	Expectoración	24/09/11	S	R	S	S	S	R	S	S	S	<i>katG315</i>	Huérfano	Unk	77635777760571
G237	Expectoración	02/10/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	2007	T3	77773767760771
G240	Expectoración	02/10/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	2007	T3	77773767760771
G252	Expectoración	10/10/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	20	LAM1	67777607760771
G257	Expectoración	10/10/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	Huérfano	Unk	77003777760771
G260	Expectoración	10/10/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	17	LAM2	677737607760771
G264	Expectoración	17/10/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	Huérfano	Unk	77003777760771
G265	Expectoración	17/10/11	R	S	S	R	R	R	S	S	S	<i>InhA (-15)</i>	34	S	77637777760771
G268	Expectoración	17/10/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	Huérfano	Unk	77003777760771
G272	Expectoración	17/10/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	1686	H1	777740004020771
G276	Expectoración	24/10/11	S	S	S	S	S	S	R	S	S	<i>ahpC (-15)</i>	478	X2	61777677760601
G277	Expectoración	24/10/11	S	S	S	S	S	R	S	S	S	<i>inhA (-15)</i>	34	S	77637777760771
G285	Expectoración	24/10/11	S	R	R	R	S	R	R	R	R	<i>inhA (-15), ahpC (-15), rpoB531</i>	406	Beijing	00000000000731
G286	Expectoración	24/10/11	S	S	S	R	S	S	S	S	S	<i>ahpC (-15)</i>	42	LAM9	77777607760771
G287	Expectoración	24/10/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>ahpC (-15)</i>	42	LAM9	77777607760771
G304	Expectoración	03/11/11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	53	T1	77777777760771
G313	Expectoración	03/11/11	S	R	R	R	S	R	R	S	S	Ninguna	137	X2	77777677760601
G318	Expectoración	09/11/11	S	R	R	R	S	R	R	S	S	<i>ahpC (-10), rpoB531</i>	137	X2	77777677760601

ANEXO III. (Continuación)

G326	Expectoración	09/11/11	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	1231	T5	777774057760771
G327	Expectoración	09/11/11	R	S	S	R	R	R	S	R	Ninguna	1231	T5	777774057760771
G331A	Expectoración	10/11/11	R	S	S	S	R	S	S	S	Ninguna	17	LAM2	677737607760771
G331B	Expectoración	10/11/11	R	S	S	S	R	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	17	LAM2	677737607760771
G332B	Expectoración	10/11/11	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>abpC</i> (-15)	1231	T5	777774057760771
G333A	Expectoración	10/11/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	42	LAM9	77777607760771
G333B	Expectoración	10/11/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	42	LAM9	77777607760771
G340	Expectoración	25/11/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	53	T1	7777777760771
G342	Expectoración	25/11/11	S	S	S	S	S	S	S	S	Ninguna	42	LAM9	77777607760771

ANEXO III. Pruebas primarias para la identificación de *M. tuberculosis* y otras micobacterias (3).

Especie	NIA	NIT	AS	Tw80	URE	NaCl	C-SQ	C-68°	INH 1	INH 10	HIDRO	P-NB	OLE	PZA	22°C	30°C	37°C	42°C	PIGMENTO	
<i>M. avium</i>	-	-	-	-	-	-	-	V	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	NO
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	NO
<i>M. ulcerans</i>	-	-	-	-	V	-	-	-	+	V	+	V	-	-	+	+	V	-	NO	
<i>M. genavense</i>	-	-	-	-	+	ND	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	-	+	+	+	NO	
<i>M. bovis</i>	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	-	NO	
<i>M. nonchromogenicum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	V	V	+	+	+	+	V	NO	
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	+	+	-	NO	
<i>M. haemophilum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	-	+	ND	+	+	+	-	-	NO	
<i>M. celatum</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	ND	ND	-	+	+	+	NO	
<i>M. terrae</i>	-	V	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	V	-	+	+	+	-	NO	
<i>M. triplex</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	-	NO	
<i>M. triviale</i>	-	+	-	V	-	+	+	+	+	+	ND	+	ND	-	+	+	+	-	NO	
<i>M. africanum</i>	V	V	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	V	+	V	NO	
<i>M. microtii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND	+	-	NO	
<i>M. malmoense</i>	-	-	-	+	V	-	-	V	+	-	V	+	-	+	+	+	+	-	NO	
<i>M. kansasii</i>	-	+	V	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	FOTO	
<i>M. marinum</i>	-	-	V	+	+	-	V	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	V	-	FOTO	
<i>M. asiaticum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	+	-	+	-	+	+	+	-	FOTO	
<i>M. simiae</i>	v	-	-	-	+	-	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	+	FOTO	
<i>M. lentiflavum</i>	-	-	-	-	-	ND	V	V	+	ND	+	+	V	V	+	+	+	-	ESCOTO	
<i>M. scrofulaceum</i>	-	V	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	ESCOTO	
<i>M. gordonae</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	V	+	V	-	+	+	+	-	ESCOTO	
<i>M. xenopi</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	V	-	+	-	V	+	+	ESCOTO	
<i>M. szulgai</i>	-	+	-	V	+	-	+	+	-	ND	-	+	+	+	+	+	+	-	ESCOTO	

NIA: Niacina; NIT: Nitratos; AS: Arilsulfatasa (3 días); Tw80: Tween 80; URE: Ureasa; NaCl: NaCl 5%; C-SQ: Catalasa semicuantitativa; C-68°: Catalasa termoestable (68°C); INH 1: Isoniacida 1 µg/ml; INH 10: Isoniacida 10 µg/ml; HIDRO: Hidroxilamina; P-NB: ácido p-nitrobenzoato; OLE: Oleato; PZA: Pirazinamidasas; 22°C, 30°C, 37°C, 42°C: Temperaturas de incubación; +: Positivo; -: Negativo; V: Variable; ND: no determinado; FOTO: Fotocromógeno; ESCOTO: Escotocromógeno; NO: No cromógeno.