

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS CLÍNICOS
DROGORRESISTENTES DE *Mycobacterium tuberculosis* EN BAJA CALIFORNIA**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

ÓSCAR ALCIDES BAROCIO LEÓN

Ensenada, Baja California

Abril de 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
CAMPUS TIJUANA

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS CLÍNICOS
DROGORRESISTENTES DE *Mycobacterium tuberculosis* EN BAJA CALIFORNIA”**

TESIS

PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO
DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

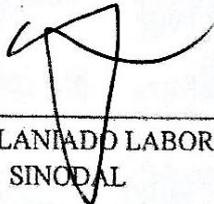
PRESENTA:

ÓSCAR ALCIDES BAROCIO LEÓN

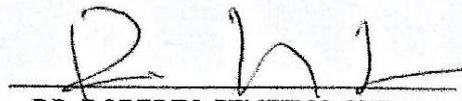
DIRECTOR:



DRA. RAQUEL MUÑIZ SALAZAR
DIRECTORA DE TESIS



DR. RAFAEL LANTADO LABORIN
SINODAL



DR. ROBERTO ZENTENO CUEVAS
SINODAL



DRA. PATRICIA RADILLA CHAVEZ
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por Su creación maravillosa y haberme predestinado para participar en Su plan, de hacer que en Cristo sean reunidas bajo una cabeza todas las cosas (Ef. 1:10).

A mis padres, Humberto Barocio Guajardo y Victoria León Ramos, por haberme guiado y brindarme su amor y ejemplo, que sigue vivo aún al haber partido ellos a la presencia de Dios.

A mi familia, Gabriela, Lucy y Dany, por su amor y apoyo. Por comprender y soportar todo el tiempo que he dejado de dedicarles para obtener este logro académico.

A mi directora, Raquel Muñiz, por su guía, apoyo y buena disposición durante todo el proceso de esta investigación.

Al personal del Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular de la UABC por procesar las muestras para el análisis molecular.

Al personal de la Clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana, por su colaboración al facilitar la base de datos epidemiológica y las muestras clínicas.

RESUMEN

Se determinaron las mutaciones presentes en genes asociados a drogorresistencia en aislados clínicos drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de la Clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana. Se seleccionaron solo los aislados para los que se contaba con datos epidemiológicos y de sensibilidad fenotípica (33 aislados). La determinación de las mutaciones se realizó mediante secuenciación de los genes *inhA*, *katG*, *rpoB*, *pncA*, *rpsL*, *rrS* y *embB*. Se determinaron los linajes por el método MIRU-VNTR con 12 loci y las asociaciones entre las variables sociodemográficas, clínicas y moleculares.

Se detectaron dos aislados con mutaciones en el gen *inhA* (promotor C-39T y S94A); cinco aislados con mutación en el gen *katG* (cinco S315T); nueve aislados con mutación en el gen *rpoB* (D516V, D516Y, dos H526D, H526Y, tres S531L y S531W); cuatro aislados con mutación en el gen *pncA* (en el promotor A-11G, H57R, A102T y uno con dos mutaciones: G105V y G150D); un aislado con mutación en el gen *rpsL* (K43R); dos aislados con mutación en el gen *rrS* (ambos en nucleótido A513C); cuatro aislados con mutación en el gen *embB* (tres M306I y uno M306V). Todas las mutaciones, excepto cinco, se asociaron a drogorresistencia en las pruebas de sensibilidad farmacológica. Se detectaron tres mutaciones nuevas en el gen *pncA*. Las demás mutaciones ya habían sido reportadas en investigaciones previas.

Los linajes con mayor frecuencia fueron el S, LAM y Ghana (6 aislados cada uno), seguido de Harlem y Beijing (4 aislados cada uno), y con menos de dos aislados los linajes Uganda I, X, Cameroon, EAI y uno no definido. El 75% de los aislados de linaje Beijing y 50% de los aislados de linaje S presentaron drogorresistencia al menos a un fármaco de primera línea; 50% de los aislados Beijing y 33% de los S fueron multidrogorresistentes (TB-MDR).

Se detectaron asociaciones estadísticamente significativas de las mutaciones en los genes *rpoB* (codón H526D, RM=11.5, IC 95% 1.01-131, P=0.05) y *rrS* (nucleótido A513C, RM=59, IC 95% 2.2-1599, P=0.02) con aislados de linaje Beijing. Se detectó asociación estadísticamente significativa de la mutación en el nucleótido C-39T del gen *inhA* (RM=63, IC 95% 1.73-2295, P=0.02) con aislados de linaje EAI.

No se detectaron asociaciones estadísticamente significativas entre las mutaciones y/o linajes y las variables sociodemográficas debido al bajo número de muestras con las que se contó. Es importante continuar la investigación sobre la drogorresistencia en Baja California para poder diseñar estrategias que abatan la alta incidencia y mortalidad de esta enfermedad en el estado.

ABSTRACT

Mutations in genes associated to drug resistance were determined in drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the Tuberculosis Clinic of Tijuana's General Hospital. Isolates with epidemiologic and phenotypic sensibility were selected (33 isolates). Mutations were determined by gene sequencing of *inhA*, *katG*, *rpoB*, *pncA*, *rpsL*, *rrS* and *embB* genes. Lineages were determined by the MIRU-VNTR of 12 loci method and associations among sociodemographic, clinical and molecular variables were determined.

Two isolates with mutations in *inhA* gene were detected (promotor C-39T and S94A); five isolates with a mutation in gene *katG* (all S315T); nine isolates with mutation in gene *rpoB* (D516V, D516Y, two H526D, H526Y, three S531L and S531W); four isolates with mutation in gene *pncA* (in promotor A-11G, H57R, A102T and one with two mutations: G105V and G150D); one isolate with mutation in gene *rpsL* (K43R); two isolates with mutation in gene *rrS* (both in nucleotide A513C); four isolates with mutation in gene *embB* (three M306I and one M306V). All mutations, with exception of five, were associated with drug resistance in drug sensibility tests. Three new mutations were detected in gene *pncA*. All other mutations were already reported in previous researches.

The more frequent lineages were S, LAM and Ghana (6 isolates each), followed by Harlem and Beijing (4 isolates each), and with less than two isolates lineages Uganda I, X, Cameroon, EAI and an undefined lineage. 75% of the Beijing isolates and 50% of S lineage were drug resistant to at least one of the first line drugs; 50% of Beijing and 33% of S isolates were multidrug resistant (TB.MDR).

Significant statistic associations were detected for mutations in genes *rpoB* (codon H526D, OR=11.5, CI 95% 1.01-131, P=0.05) and *rrS* (nucleotide A513C, OR=59 , IC 95% 2.2-1599, P=0.02) with Beijing isolates. A statistic significant association was detected for the mutation in nucleotide C-39T of gene *inhA* (OR=63 , CI 95% 1.73-2295, P=0.02) with isolates of EAI lineage.

Statistic significant associations were not detected among mutations and/or lineages and sociodemographic variables due to few sample number. It is important to continue research on drug resistance in Baja California to design strategies that lead to take down the high incidence and mortality of this disease in the state.

Esta investigación fue realizada con financiamiento de los proyectos:

Estudio genético de cepas farmacorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* en Baja California. 14^a Convocatoria Interna UABC (2010-2011) Programa No. 4276.

Epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en la frontera Noroeste México-Estados Unidos. CONACyT-Ciencia Básica 2011, No. 166624.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	4
2.1	Definición de Tuberculosis	4
2.2	Signos y síntomas	4
2.3	Transmisión	5
2.4	Tratamiento	5
2.5	Diagnóstico de la tuberculosis	6
2.5.1	Métodos clásicos	6
2.5.2	Métodos moleculares	7
2.6	Genotipificación	7
2.7	Situación epidemiológica	10
2.7.1	Migración	12
2.8	Drogoresistencia	13
2.8.1	Mecanismos moleculares generadores de drogoresistencia a fármacos de primera línea.	16
3	HIPÓTESIS	20
4	OBJETIVOS	21
4.1	Objetivo general	21
4.2	Objetivos específicos	21
5	MATERIALES Y MÉTODO	22
5.1	Población de estudio y obtención de muestras	22
5.1.1	Criterios de inclusión	22
5.2	Análisis microbiológico	23
5.2.1	Pruebas de sensibilidad	23
5.3	Análisis Molecular	23
5.3.1	Extracción de ADN	23
5.3.2	Identificación molecular de especies	24
5.3.3	Determinación de linajes por MIRU-VNTR 12	25

5.3.4	Caracterización de mutaciones en genes asociadas a drogorresistencia para fármacos de primera línea.	25
5.3.5	Análisis de mutaciones	26
5.4	Análisis epidemiológico molecular	28
6	RESULTADOS	32
6.1	Población de estudio	32
6.2	Características sociodemográficas	32
6.2.1	Sexo y Edad	32
6.2.2	Lugar de nacimiento y lugar de residencia	35
6.3	Características clínicas	37
6.3.1	Tratamiento	40
6.3.2	Comorbilidades	47
6.3.3	Características de drogorresistencia (fenotípica y molecular) y linajes	49
6.3.4	Comparación entre sensibilidad farmacológica, drogorresistencia molecular, tipo de egreso y tratamiento administrado.	63
6.4	Análisis epidemiológico molecular	67
6.4.1	Asociación de variables sociodemográficas y clínicas con la sensibilidad farmacológica	67
6.4.2	Asociación de variables sociodemográficas y clínicas con la drogorresistencia molecular	69
6.4.3	Asociación entre linajes y mutaciones asociadas a drogorresistencia	74
6.4.4	Asociación de la drogorresistencia detectada por características fenotípicas (sensibilidad farmacológica) y moleculares (mutaciones)	79
7	DISCUSIÓN	81
7.1	Identificación las mutaciones presentes en los genes asociados a drogorresistencia contra fármacos de primera línea, inhA y katG (isoniacida), rpoB (rifampicina), pncA (pirazinamida), rpsL y rrS (estreptomicina) y embB	

	(etambutol), en aislados de <i>M. tuberculosis</i> drogorresistente provenientes de Baja California.	81
7.1.1	Gen <i>inhA</i>	83
7.1.2	Gen <i>katG</i>	84
7.1.3	Gen <i>rpoB</i>	86
7.1.4	Gen <i>pncA</i>	88
7.1.5	Gen <i>rpsL</i>	91
7.1.6	Gen <i>rrS</i>	92
7.1.7	Gen <i>embB</i>	94
7.2	Determinación de la asociación entre la drogorresistencia detectada por características fenotípicas (sensibilidad farmacológica) y moleculares (mutaciones) en los aislados de <i>M. tuberculosis</i> drogorresistentes de Baja California.	95
7.2.1	Mutaciones que no confirieron drogorresistencia.	96
7.3	Determinación de la asociación entre los linajes por MIRU-VNTR 12 loci y las mutaciones de genes asociados a drogorresistencia a los cinco fármacos de primera línea.	97
7.4	Determinación de la asociación entre las características epidemiológicas, linajes y las mutaciones identificadas en los genes analizados en los aislados de <i>M. tuberculosis</i> drogorresistentes de Baja California.	102
8	CONCLUSIONES	103
9	LITERATURA CITADA	105
10	ANEXOS	117
10.1	Anexo 1. Encuesta realizada para el estudio epidemiológico de tuberculosis	117
10.2	Anexo 2. Glosario	119
	Abandono: Interrupción del tratamiento durante 30 días o más.	119
10.3	Anexo 3. Abreviaturas	121
10.4	Anexo 4. Tablas de datos	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de la muestra de estudio clasificados por grupo de edad y sexo. (n=33; H: hombre; M: mujer).	34
Figura 2. Número de casos de la muestra de estudio de acuerdo al lugar de nacimiento (n=33). Barra en azul oscuro indica la sumatoria de todos los casos foráneos a Baja California (BC). En azul claro se muestra la misma información por estado, sin incluir BC (BCS: Baja California Sur; DF: Distrito Federal).....	35
Figura 3. Número de casos de la muestra de estudio de acuerdo al lugar de residencia y años viviendo en el mismo (n=33; ND: No determinado, BC: Baja California, BCS: Baja California Sur).	36
Figura 4. Número de casos de la muestra de estudio de acuerdo al año de diagnóstico (n=33; ds=1.5).	38
Figura 5. Número de casos de la muestra de estudio de acuerdo a la baciloscopía (n=33).	39
Figura 6. Número de casos según el tipo de ingreso y sexo del paciente (n=33).	40
Figura 7. Número de casos de acuerdo al tratamiento administrado (n=33). Tx: tratamiento; Retrat: retratamiento; Segunda L.: tratamiento con fármacos de segunda línea).	41
Figura 8. Número de casos de acuerdo al tiempo de tratamiento en meses (n=33).	42
Figura 9. Número de casos según el tipo de egreso y sexo (n=33; Tx: Tratamiento). .	43
Figura 10. Número de casos de acuerdo al tiempo de tratamiento en meses y según el tipo de egreso del paciente (n=33, Tx: tratamiento).	44
Figura 11. Número de casos según el tipo de egreso e ingreso (n=33; Tx: Tratamiento).	45
Figura 12. Número de casos según el tipo de egreso y el tipo de tratamiento administrado (n=33; Tx: Tratamiento; Seguna L.: tratamiento con fármacos de segunda línea; Retrat: Retratamiento).	46
Figura 13. Número de casos por comorbilidad y por sexo (n=33; Sx: síndrome).	47
Figura 14. Número de casos de acuerdo al egreso y a las enfermedades asociadas a la TB (n=33; Tx: tratamiento; Sx: síndrome).	48
Figura 15. Número de casos de acuerdo a la combinación de drogorresistencia farmacológica y clasificación de la misma (n=33; H: isoniazida; R: rifampicina; Z: pirazinamida; S: estreptomycin; E: etambutol; TB-DR: tuberculosis drogorresistente; TB-PR: tuberculosis polirresistente; TB-MDR: tuberculosis multi-drogorresistente; Nivel de drogorresistencia según clasificación de pág. 63).	50

Figura 16. Número de casos de acuerdo al linaje determinado por MIRU-VNTR 12 y de acuerdo a la combinación de mutaciones en genes asociados a drogorresistencia (n=33; Fármacos de acuerdo a abreviaturas de Tabla I; SM: sin mutación; No def: linaje no definido; linajes tomados de García-Ortiz (2013)	60
Figura 17. Número de casos de acuerdo al linaje determinado por MIRU-VNTR 12 y a la sensibilidad farmacológica (n=33; Fármacos de acuerdo a abreviaturas de Tabla I; No def: Linaje no definido; linajes tomados de (García-Ortiz, 2013) ...	61
Figura 18. Número de aislados de acuerdo a su drogorresistencia farmacológica y molecular (n=33; sm: sin mutaciones).	63
Figura 19. Número de casos de acuerdo al egreso y a la drogorresistencia farmacológica (n=33; Abreviaturas de fármacos de acuerdo a Tabla I).	64
Figura 20. Número de casos según el tratamiento administrado y el tipo de egreso del paciente (Tx: tratamiento; Retrat.: retratamiento; Segunda L.: tratamiento con fármacos de segunda línea).	65
Figura 21. Número de casos de acuerdo al egreso y a la drogorresistencia molecular (n=33; Abreviaturas de fármacos de acuerdo a Tabla I; Tx: tratamiento; sm: sin mutaciones).....	66
Figura 22. Número de aislados que presentaron mutaciones, clasificados por linaje y drogorresistencia molecular por fármaco de primera línea. Linajes tomados de García-Ortiz (2013).....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Genes que se asocian a drogorresistencia contra fármacos antituberculosos, sus abreviaturas, números de acceso en la base de datos de “GeneBank” (Gene ID), cebadores utilizados para su amplificación y tamaño del fragmento amplificado en pares de bases (pb), para la cepa de referencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).	27
Tabla II. Clasificación de acuerdo al grado de drogorresistencia farmacológica y molecular (Secretaría de Salud, 2013).	29
Tabla III. Tabla tetracórica para el cálculo de razones de momios (RM).	30
Tabla IV. Datos sociodemográficos de pacientes infectados con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> analizados en este estudio.	33
Tabla V. Datos clínicos de pacientes infectados con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> drogorresistente analizados en este estudio.	37
Tabla VI. Características de drogorresistencia farmacológica y molecular de los aislados, incluyendo linaje por MIRU-VNTR 12	49
Tabla VII. Número de aislados secuenciados para los siete genes asociados a drogorresistencia, indicando el número de aislados que presentaron mutaciones.	51
Tabla VIII. Relación de aislados con mutaciones en el gen <i>rpoB</i> , asociado a resistencia contra rifampicina y sensibilidad para éste fármaco.	53
Tabla IX. Relación de aislados con mutaciones en el gen <i>inhA</i> , asociado a resistencia contra isoniazida, y sensibilidad para éste fármaco.	54
Tabla X. Relación de aislados con mutaciones en el gen <i>katG</i> , asociado a resistencia contra isoniazida, y sensibilidad para éste fármaco.	55
Tabla XI. Relación de aislados con mutaciones en el gen <i>pncA</i> , asociado a resistencia contra pirazinamida, y sensibilidad para éste fármaco.	56
Tabla XII. Relación de aislados con mutaciones en el gen <i>rpsL</i> , asociado a resistencia contra estreptomina, y sensibilidad farmacológica para éste fármaco.	57
Tabla XIII. Relación de aislados con mutaciones en el gen <i>rrS</i> , asociado a resistencia contra estreptomina, y sensibilidad para éste fármaco.	58
Tabla XIV. Relación de aislados con mutaciones en el gen <i>embB</i> , asociado a resistencia contra etambutol, y sensibilidad para éste fármaco.	59
Tabla XV. Mutaciones que presentó cada aislado en genes asociados con drogorresistencia para fármacos de primera línea, en términos de codones, ordenados por tipo de egreso y linaje (MIRU-VNTR 12).	62

Tabla XVI. Número de casos clasificados según las variables sociodemográficas y clínicas de acuerdo al nivel de drogorresistencia farmacológico y razón de momios con sus parámetros estadísticos.	68
Tabla XVII. Número de casos clasificados según las variables sociodemográficas y clínicas de acuerdo a la presencia o ausencia de mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para los fármacos de primera línea.	70
Tabla XVIII. Número de casos clasificados según las variables sociodemográficas y clínicas de los grupos de aislados sin mutaciones y clasificado molecularmente como TB-DR + TB-PR.	72
Tabla XIX. Número de casos clasificados según las variables sociodemográficas y clínicas de los grupos de aislados sin mutaciones y clasificado molecularmente como TB-MDR.	73
Tabla XX. Número de aislados de acuerdo al linaje determinado por MIRU-VNTR 12, indicando el número de mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para los fármacos de primera línea.	75
Tabla XXI. Número de aislados de acuerdo al linajes y drogorresistencia molecular por grupo, clasificados de acuerdo a la presencia o ausencia de mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para fármacos de primera línea.	76
Tabla XXII. Número de aislados de acuerdo al linaje y drogorresistencia molecular agrupando los que no presentaron mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para fármacos de primera línea y los clasificados TB-DR + TB-PR molecularmente.	77
Tabla XXIII. Número de aislados de acuerdo al linaje y drogorresistencia molecular agrupando los que no presentaron mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para fármacos de primera línea y los clasificados TB-MDR molecularmente.	78
Tabla XXIV. Análisis de asociación entre drogorresistencia fenotípica y molecular para los siete genes asociados a drogorresistencia para los cinco fármacos de primera línea.	79
Tabla XXV. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para H con polimorfismo en el gen <i>inhA</i> detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.	83
Tabla XXVI. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para H con polimorfismo en el gen <i>katG</i> detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.	84

Tabla XXVII. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para R con polimorfismo en el gen <i>rpoB</i> detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.	86
Tabla XXVIII. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para Z con polimorfismo en el gen <i>pncA</i> detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.	88
Tabla XXIX. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para S con polimorfismo en el gen <i>rpsL</i> detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.	91
Tabla XXX. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para S con polimorfismo en el gen <i>rrS</i> detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.	92
Tabla XXXI. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para E con polimorfismo en el gen <i>embB</i> detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.	94
Tabla XXXII. Asociaciones estadísticamente significativas entre mutaciones y linajes obtenidos mediante MIRU-VNTR de 12 loci.	101
Tabla XXXIII. Relación de genes amplificados para cada aislado.	122
Tabla XXXIV. Información de resistencia en cultivo (CULT), mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia (MOLEC) de los 5 fármacos de primera línea y egreso.	123

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es la enfermedad infecciosa que causa el mayor número de muertes en adultos a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que un tercio de la población mundial está infectada y estima una incidencia de 8.6 millones de casos y una mortalidad de 1.3 millones. Aunque éstas cifras han disminuido de 2012 a 2013, la mortalidad debida a TB sigue siendo inaceptable, considerando que la mayoría de las muertes son prevenibles (Organización Mundial de la Salud, 2012, 2013).

La OMS en el 2013 estableció cinco acciones prioritarias para cumplir con los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM) en el 2015:

- 1. Detección de los casos que se escapan a los sistemas de detección nacionales.*
- 2. Abordar a la TB multidrogorresistente (TB-MDR) como una crisis de salud pública.*
- 3. Acelerar la respuesta contra la co-infección TB/VIH.*
- 4. Incrementar el financiamiento para cubrir el déficit de recursos que hasta el 2013 ha habido.*
- 5. Asegurar la rápida asimilación de las innovaciones en el diagnóstico, tratamiento y prevención de todas las formas de TB.*

Estas metas están basadas en el historial que hasta ahora se tiene de la enfermedad en el cual han influido diversos factores, entre los que se destaca la dificultad en el control de la TB debido a la co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la asociación con el incremento en los casos de Diabetes Mellitus (DM) y el aumento de los casos de TB drogorresistente (TB-DR) (Organización Mundial de la Salud, 2010). El impacto de la TB-DR se debe a sus altos costos de tratamiento y al retraso en su diagnóstico, ubicándola como una seria amenaza para el control de la enfermedad, ya que al retardarse su diagnóstico se fomenta su diseminación entre los contactos del enfermo.

Para el diagnóstico de la TB-DR se utilizan cultivos con antibiograma o técnicas radiométricas que arrojan resultados en un lapso de 6 a 8 semanas (Palma-Nicolás y Bocanegra-García, 2007; Secretaría de Salud, 2010); si durante dicho periodo los

pacientes no reciben el tratamiento adecuado tendrán una menor probabilidad de curación, además de contribuir a la diseminación de la enfermedad con el consecuente aumento en la incidencia de TB-DR.

El avance en las técnicas de la biología molecular en los últimos años ha permitido que se comience a responder ante el aumento en la incidencia de la TB-DR, implementando técnicas para la caracterización de *Mycobacterium* y la identificación de mutaciones causantes de drogorresistencia. La diferenciación entre las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* requiere de marcadores moleculares (Huard et al., 2003, 2006). En cuanto a la drogorresistencia, la secuenciación ha sido la técnica de referencia para identificar mutaciones asociadas a la resistencia a los diferentes fármacos antituberculosos (Palma-Nicolás y Bocanegra-García, 2007; Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010).

Actualmente, se encuentran disponibles en internet bases de datos de mutaciones y la drogorresistencia asociada a ellas que recopilan investigaciones a nivel mundial (Sandgren et al., 2009). En México existen algunos reportes de las características moleculares de cepas circulantes de TB-DR (Palma-Nicolás y Bocanegra-García, 2007; Zenteno-Cuevas et al., 2009; Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010; Bojorquez-Chapela et al., 2013), sin embargo, la mayoría de éstos han sido en regiones muy localizadas y aún hace falta mucha información a lo largo y ancho de todo el país, especialmente Baja California, estado colocado como el de mayor incidencia (54.4 casos por cada 100 mil habitantes) y mortalidad (5.7 muertes por cada 100 mil habitantes) en la estadística nacional (Secretaría de Salud, 2014).

No fue sino hasta el periodo 2008-2009 que se realizó en México la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia a la TB (ENTB-2008), que, aunque fue diseñada para tener representatividad nacional, solo se estudiaron nueve estados de la República Mexicana (Baja California, Chihuahua, Estado de México, Guanajuato, Morelos, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa y Yucatán). En este estudio se estimó una prevalencia de TB-MDR de 2.8% (IC 95% 1.9 – 4.0), la cual se asoció al antecedente de tratamiento previo (RM 3.3; IC 95% 1.1–9.4), sentando una base comparativa para futuros estudios de DR en México (Bojorquez-Chapela et al., 2013). La DR fue determinada por medio de pruebas de sensibilidad farmacológica en cultivo, pero no se caracterizaron molecularmente las cepas drogorresistentes para correlacionar los resultados de las mismas con las mutaciones específicas de esas cepas.

A mediano y largo plazo, los estudios de caracterización molecular de las cepas drogorresistentes serán de gran utilidad, ya que permitirá a establecer

metodologías diagnósticas para la detección oportuna de TB-DR (Cuevas-Córdoba et al., 2015), que permitan implementar tratamientos farmacológicos efectivos e individualizados con oportunidad, lo cual sin duda contribuirá enormemente al combate y control de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo consiste precisamente en caracterizar molecularmente las cepas drogorresistentes que circulan en Baja California, contribuyendo con información para el mejor entendimiento de los mecanismos de drogorresistencia, origen de las cepas y mecanismos de propagación de la TB en la región. La relevancia de la caracterización molecular de las cepas drogorresistentes en esta región se incrementa al ser Baja California un estado con intensa migración por su localización fronteriza con Estados Unidos y ser el estado de mayor prevalencia y mortalidad por TB en el país.

1 ANTECEDENTES

1.1 Definición de Tuberculosis

El Complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), comprende a las especies bacterianas de *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, y a las más recientemente reconocidas *M. canettii* y *M. caprae*, las cuales son los agentes causales de la enfermedad infecciosa conocida como tuberculosis (TB) (Brosch et al., 2002; Mostowy et al., 2002).

No todas las personas infectadas por las bacterias del complejo CMT enferman de TB. Las personas portadoras de la bacteria que no enferman, tienen lo que se denomina una infección latente y no se sienten enfermas, no presentan síntomas ni pueden transmitir la enfermedad a otras personas. Sin embargo, algunas personas con TB latente, pueden en cualquier momento, desarrollar la enfermedad, sintiéndose enfermos y presentando síntomas; y estas personas sí pueden contagiar a otros (Longo et al., 2012).

La TB suele dividirse en pulmonar y extra pulmonar, siendo la pulmonar (TBP) la más frecuente en México (81.6% de todos los casos). En cuanto la extra pulmonar, incluye una gran variedad, entre los que destacan por su incidencia la ganglionar, renal, miliar, meníngea, pleural, intestinal y ósea (Secretaría de Salud, 2014). En México se ha detectado que la TB extra pulmonar aumenta su incidencia en niños menores de 10 años, llegando a ser de hasta el 55% de los casos (Secretaría de Salud, 2011).

1.2 Signos y síntomas

La TBP primaria aparece poco después de la infección inicial por bacilos de *M. tuberculosis*. Puede ser asintomática o tener en sus inicios, fiebre, tos, sudores nocturnos, pérdida de peso, expectoración crónica y a veces dolor pleurítico. Los signos dependen de la localización, es posible observar úlceras en la laringoscopia (Longo et al., 2012). Los síntomas pueden ser leves durante muchos meses, por lo que la mayoría de las veces, los pacientes tardan en buscar atención médica y transmiten la bacteria a otras personas. A lo largo de un año, un enfermo tuberculoso puede infectar a unas 10 a 15 personas por contacto estrecho. Si no reciben el tratamiento adecuado, hasta dos terceras partes de los enfermos tuberculosos mueren (Organización Mundial de la Salud, 2015).

1.3 Transmisión

La TB se propaga principalmente por vía aérea cuando los bacilos de *M. tuberculosis* son expelidos por una persona afectada con TBP al hablar, estornudar o toser. En general, una proporción relativamente pequeña de personas infectadas con *M. tuberculosis* desarrolla la enfermedad; sin embargo, la probabilidad de desarrollar la enfermedad es mucho mayor entre las personas infectadas por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y personas con depresión del sistema inmune debida a otra causa, como la diabetes (Pérez-Navarro et al., 2011, 2015). También es más común en hombres que en mujeres, y afecta principalmente a adultos en edad productiva (Organización Mundial de la Salud, 2012).

1.4 Tratamiento

La Norma Oficial Mexicana publicada en el Diario Oficial de la Federación en 2013 (NOM-006-SSA2-2013), reglamenta la manera en que se debe llevar a cabo el tratamiento en el caso de la TB en México. Los tratamientos se clasifican en: 1) primario acortado, 2) retratamiento con fármacos de primera línea, 3) retratamiento estandarizado con fármacos de segunda línea para TB-MDR y 4) retratamiento individualizado con fármacos de segunda línea para TB-MDR o de acuerdo a antecedente de tratamiento; todos deben ser estrictamente supervisados por personal de salud. Los dos últimos deben ser prescritos por el personal de salud experto en drogoresistencia y evaluados por el Comité Estatal de Farmacorresistencia (COEFAR), autorizado por el Grupo Asesor Nacional de Farmacorresistencia (GANAFAR). Los detalles de cada una de estas clasificaciones se estipulan en la NOM-006-SSA2-2013 (Secretaría de Salud, 2013).

Los fármacos de primera línea que se utilizan en el tratamiento primario de la TB son: Isoniacida (H), Rifampicina (R), Pirazinamida (Z), Etambutol (E) y Estreptomina (S). Los de segunda línea son: kanamicina (Km), amikacina (Am), capreomicina (Cm), etionamida (Eto), protionamida (Pto), ofloxacina (Ofx), levofloxacina (Lfx), moxifloxacina (Mfx) y ciclocerina (Cs) (Secretaría de Salud, 2013).

La NOM-006-SSA2-2013 estipula que la mejor forma de prevenir la drogoresistencia en TB es a través de la detección oportuna y curación de todos los casos nuevos, con esquemas primarios estrictamente supervisados. Menciona que se debe sospechar drogoresistencia en todo paciente con TB que curse con recaída,

múltiples abandonos y fracaso a un esquema de retratamiento primario. En la TB-MDR se debe demostrar por cultivo la presencia de bacterias resistentes a H y R en forma simultánea, independientemente de la resistencia concomitante a otros fármacos.

1.5 Diagnóstico de la tuberculosis

1.5.1 Métodos clásicos

La baciloscopía ácido alcohol resistente (BAAR) por tinción de Ziehl-Neelsen es el procedimiento estándar en la mayoría de los laboratorios. Sin embargo, es sensible solo en pacientes bacilíferos de 5,000 – 10,000 bacterias por mililitro en la muestra clínica, lo cual es una de sus limitantes (Bloom, 1994). El cultivo microbiológico, es el estándar de oro como diagnóstico confirmatorio en pacientes con cuadro clínico sugestivo de TB y con baciloscopías negativas. Sin embargo, tiene la desventaja de tardar entre seis a ocho semanas para su confirmación y solo se realiza en laboratorios de referencia, alejados de los centros de atención de primer y segundo nivel, lo cual retrasa el inicio del tratamiento y favorece la dispersión de la TB (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010).

Debido a la necesidad de acortar el tiempo de la confirmación diagnóstica, han surgido métodos de detección de micobacterias mucho más rápidos, como el sistema BACTEC 460TB, que fue el primer sistema de detección que disminuyó significativamente el tiempo (entre 2 y 4 semanas), pero presenta la desventaja de utilizar sustancias radioactivas para la detección (Tortoli et al., 1999). El método BACTEC MGIT 960 es un método no radiométrico de detección de micobacterias que provee resultados confirmatorios en lapsos de tiempo comparables al sistema BACTEC 460TB, y utiliza un sensor de oxígeno de rutenio pentahidratado en el fondo de tubos que contienen 8 mL de medio de cultivo Middlebrook 7H9. La detección se realiza mediante fluorescencia, al reducirse el oxígeno gracias al metabolismo de bacterias aerobias que se encuentran presentes en el medio de cultivo. Tiene la capacidad de procesar 960 muestras simultáneamente y reduce el tiempo de detección a aproximadamente la mitad del tiempo, comparando con el cultivo tradicional en medio L-J (Tortoli et al., 1999).

1.5.2 Métodos moleculares

La identificación de la especie de *Mycobacterium* en los aislados microbiológicos clínicos es de gran importancia para poder aplicar el tratamiento farmacológico adecuado. Por ejemplo, la infección por *M. tuberculosis* es clínica y radiológicamente indistinguible de la causada por *M. bovis*, y las lesiones no se diferencian morfológica o histológicamente, por lo que se debe recurrir al cultivo, a las pruebas bioquímicas y a las técnicas moleculares para lograr el diagnóstico diferencial. Esto es importante, debido a que el tratamiento en infecciones por *M. bovis* debe omitir el uso de la pirazinamida, a la cual este organismo es naturalmente resistente. En la región de Baja California-California, se ha incrementado el número de casos de TB por *M. bovis* (Dankner y Davis, 2000; Rodwell et al., 2008, 2010; Laniado-Laborín et al., 2014), por lo que ha aumentado la probabilidad de encontrar cepas de *M. bovis* en humanos, haciendo que la diferenciación sea aún más relevante.

Se han desarrollado técnicas moleculares que superan la sensibilidad y la especificidad de las pruebas tradicionales. Estas técnicas facilitan el diagnóstico temprano, permitiendo el expedito inicio del tratamiento y disminuyendo los costos del sector salud. Con los métodos de extracción de DNA disponibles, ahora es posible la identificación de micobacterias a partir de cualquier muestra biológica y en un periodo de tiempo corto, en comparación con los métodos tradicionales (Morán Moguel et al., 2000; California Department of Public Health, 2009a).

1.6 Genotipificación

Para la caracterización molecular de la TB, se han desarrollado métodos moleculares de genotipificación. Los primeros estudios para identificar los genotipos en *M. tuberculosis* se realizaron mediante la técnica del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del elemento de inserción IS6110 (RFLP-IS6110) (Cave et al., 1991). Posteriormente, surgió el espoligotipado, basado en la detección de la presencia o ausencia de 43 oligonucleótidos espaciadores que flanquean una región del elemento de inserción IS6110 llamada de repetición directa (Kamerbeek et al., 1997; Molhuizen et al., 1998).

Actualmente, el método de genotipificación que ha mostrado más aceptación, confiabilidad y poder discriminatorio entre cepas, es el denominado “número variable de unidades interespaciadas de repetición en tándem micobacterianas” (MIRU-VNTR, por sus siglas en inglés) (Supply et al., 2000, 2006; Mazars et al., 2001a; Supply, 2005). Ésta técnica se ha desarrollado como una alternativa a los métodos previos

para casos en que la especie de bacteria es genéticamente homogénea, como en *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* y los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Supply, 2005). Se basa en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante cebadores específicos para las regiones que flanquean a los VNTRs, y la determinación de los tamaños de los productos amplificados por medio de electroforesis. Al conocer la longitud de las unidades de repetición, sus tamaños reflejan el número de repeticiones de los VNTR amplificados. El producto final es una clave numérica que corresponde al número de repeticiones de cada locus de VNTR. Éstos genotipos numéricos son particularmente convenientes tanto para estudios comparativos intra e inter-laboratorios. Además, en comparación con la técnica RFLP-IS6110, la tipificación por MIRU-VNTR tiene las ventajas de ser más rápida y apropiada para virtualmente todos los aislados de *M. tuberculosis*, incluyendo cepas que posean pocas copias de IS6110 (Supply, 2005; Supply et al., 2006)

Los marcadores MIRU-VNTR (Supply et al., 2000; Mazars et al., 2001a) representan una estrategia de genotipado 100% reproducible, sensible y específica, con un alto poder de discriminación entre las cepas del complejo *M. tuberculosis*, aun tratándose de cepas del genotipo de Beijing (Supply et al., 2000; Mazars et al., 2001b; Cowan et al., 2002; Cardoso-Oelemann et al., 2007; Allix-Béguec et al., 2008). Se encuentran dispersos en 41 regiones del cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv, de los cuales 12, 15 y 24 son altamente polimórficos (Supply et al., 2006). Se caracterizan por tener un tamaño 51 a 77 pb de longitud, son polimórficos en el número de repeticiones en tándem y a nivel de secuencia entre las unidades de repetición. Los genes que flanquean los MIRU están involucrados en diversas vías metabólicas que incluyen lípidos, ácidos nucleicos, biosíntesis o degradación de proteínas, producción de energía y la transducción de señales (Supply et al., 2000). El método de MIRU-VNTR es el más utilizado en la actualidad para la caracterización genética en aislados del complejo *M. tuberculosis*; incluso para aquellas cepas con un número reducido de copias del elemento IS6110. Tiene la gran ventaja de ser un procedimiento automatizado y para el que se cuenta con bases de datos de acceso público que permiten el análisis y la comparación de resultados en forma rápida y precisa (Mazars et al., 2001b; Supply et al., 2001; Allix et al., 2004). Diversas investigaciones han utilizado los MIRU-VNTR para estudios genéticos y epidemiológicos, así como para analizar cambios evolutivos en las poblaciones de patógenos y para darle seguimiento a los brotes infecciosos de *M. tuberculosis* (Supply et al., 2001; Allix et al., 2004). Asimismo, se han empleado para detectar infecciones de TB por múltiples cepas, para identificar contaminación cruzada en laboratorios,

determinar el origen y dispersión de las cepas (Allix et al., 2004; Wirth et al., 2008; Dickman et al., 2010).

1.6.1.1 Distribución mundial de los principales linajes

Se ha reportado una alta diversidad de linajes por espoligotipado y MIRU-VNTR, siendo los linajes LAM, Beijing, EAI, Haarlem, S, X, Dehli/CAS y Bovis los reportados por ambos marcadores; los linajes T, AFRI y MANU son determinados exclusivamente por espoligotipado, mientras que los linajes Ghana, Cameroon, NEW-1, Uganda I, Uganda II, TUR y URAL son determinados por MIRU-VNTR.

En América del Norte se han reportado todos los linajes, mientras que en Europa los linajes predominantes son T y Haarlem. África, América Central, Europa y América del Sur, coinciden en la presencia de Haarlem, LAM y T como los principales linajes. En Asia los linajes predominantes son Beijing, EAI y CAS (Demay et al., 2012). El linaje Latinoamericano y del mediterráneo (LAM) representa cerca del 50% de los casos de TB en América del Sur (Demay et al., 2012), mientras que en Venezuela (65%), en el Mediterráneo y en la región del Caribe es el linaje predominante (Brudey et al., 2006). El linaje T se ha determinado en todos los países, pero es predominante en Europa y Asia Occidental con 35% de los casos de TB, en América del Norte y del Sur representa el 20% y 27% de los casos, respectivamente (Demay et al., 2012).

1.7 Situación epidemiológica

A nivel mundial, la TB ocupa uno de los primeros lugares dentro de las prioridades de las agendas pendientes por resolver en materia de salud para la OMS. A pesar de haber alcanzado ya la meta establecida en los Objetivos del Milenio, consistente en detener y revertir la tendencia ascendente en la prevalencia de TB para el 2015, la carga global de esta enfermedad sigue siendo enorme. En 2011, se estimaron 8.7 millones de casos nuevos y 1.4 millones de personas muertas por TB. La TB es una de las enfermedades que causa más muertes en mujeres - 500 mil muertes en 2011 (Organización Mundial de la Salud, 2012).

México fue ubicado entre los nueve países de alta carga de TB de las Américas por la OMS en 2008 (Organización Mundial de la Salud, 2008). En México, la TB es un problema de salud pública, considerado como tal en el Plan Nacional de Salud 2007-2012 (Secretaría de Salud, 2007) y actualmente incorporado al Plan Mundial para Detener la Tuberculosis 2006-2015, formulado por el "Comité Alto a la Tuberculosis" de la OMS (Hernández-Hernández y Rodríguez, 2009). De acuerdo a la Secretaría de Salud de México, de 2010 a 2011 hubo un incremento de 18,848 a 19,445 casos

nuevos de TB en todas sus formas, siendo en 2011 81.5% pulmonar, 1.6% meníngea, 5.6 ganglionar y 11.4 otras formas. El 20.8% de casos nuevos están asociados a diabetes, el 9.3% son de pediatría (< 19 años) y el 7.8% asociados con SIDA (Secretaría de Salud, 2012).

La tasa de incidencia de TB en todas sus formas en Baja California para 2013 fue de 54.4, siendo 3.3 veces mayor que la nacional (16.4). Otros estados que reportaron tasas de incidencia de TB mayores a 25 fueron, en orden descendente, Guerrero (37.9), Tamaulipas (33.0), Sonora (29.9), Sinaloa (29.9), Veracruz (26.7) y Tabasco (26.5). Además, la tasa de mortalidad más alta para el 2012 también se presentó en Baja California (5.7), siendo alarmantemente el triple de la tasa nacional (1.9) (Secretaría de Salud, 2014).

1.7.1 Migración

Un factor de relevancia en la epidemiología de la TB es la migración (Garfein et al., 2011). Baja California es uno de los estados considerados como zona de atracción de migrantes indígenas, principalmente procedentes de los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Guerrero (Rubio et al., 2000). Según el censo del Instituto Nacional de Estadística y Geografía de 2010, el 45.1% de los residentes en BC nacieron fuera de la entidad, incrementándose en 1.5% la tasa de migración respecto del censo del año 2000, lo que indica que la tendencia migratoria se ha ido incrementando (Gobierno de Baja California, 2014)

En la región agrícola de San Quintín, localizada en el municipio de Ensenada, Baja California, residen de 30,000 – 40,000 personas que trabajan en la actividad agrícola, de los cuales, aproximadamente 15,000 son migrantes, principalmente de los estados ya mencionados (Rubio et al., 2000; SEDESOL, 2007; Consejo Nacional de Población, 2009). En un estudio realizado en una comunidad de San Quintín se registró una prevalencia del 40% de infección latente de TB. De estos, una tercera parte reportó que había viajado a Estados Unidos (EU) o al área de la frontera desde su llegada a San Quintín. Durante 2008, aproximadamente el 75% de los casos de TB en California eran de personas nacidas fuera de EU, la mayoría de origen mexicano (n = 623) (Garfein et al., 2011).

De los casos de TB reportados en San Diego el 20% fueron personas originarias de México que han sido diagnosticados dentro del año posterior a su arribo a EU (California Department of Public Health, 2009a; b). Se ha registrado un flujo de personas entre Baja California y California de aproximadamente 80 millones de cruces al año, lo que equivale a 219,178 cruces por día. La congregación de individuos infectados con TB de forma latente y el alto índice de migración del sur de México hacia la frontera Baja California-California, y el retorno de los mismos a sus ciudades de origen después de un periodo de tiempo en la zona, contribuyen a la dispersión de la TB (Garfein et al., 2011).

Debido a que Baja California presenta una alta prevalencia de TB, en muchos de los casos no se consideran otros diagnósticos diferenciales para poder confirmar que el paciente realmente presente la enfermedad, iniciándose de esta manera tratamientos injustificados. Consecuentemente, el tratamiento fracasa a las semanas o meses y la salud del paciente se deteriora. La resistencia a los antimicrobianos es un mecanismo natural de defensa de los microorganismos que generalmente es desencadenado por el hombre. El uso de monoterapia en el tratamiento de la

tuberculosis, la falta de apego del paciente al tratamiento por diversos factores, el empleo de regímenes de tratamiento inadecuados, el abastecimiento incompleto de los medicamentos antituberculosos, así como el empleo de medicamentos de mala calidad, si bien evita el crecimiento del bacilo, permite la multiplicación de cepas resistentes (Zúñiga-Carrasco y Caro-Lozano, 2013).

1.8 Drogorresistencia

De acuerdo a la OMS (2014), la TB-MDR, se define como aquellas cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes por lo menos a los dos fármacos antituberculosos de primera línea más potentes: la rifampicina e isoniacida. Mientras que la TB extremadamente drogorresistente (TB-XDR) se define como aquella que es resistente a una fluoroquinolona y por lo menos a uno de los tres antibióticos inyectables de segunda línea amikacina, capreomicina o kanamicina) (Secretaría de Salud, 2013; Organización Mundial de la Salud, 2014).

Los casos de TB-MDR difícilmente se curan, particularmente si padecen algún desorden de inmunodeficiencia, VIH/ SIDA o desnutrición. Además, su tratamiento es más tóxico y costoso que el tratamiento de pacientes con cepas sensibles (Mitchison y Nunn, 1986; Frieden et al., 1996). Se estima que en 2012, a nivel mundial, 8.6 millones de personas desarrollaron TB y 1.43 millones murieron por su causa (320 mil asociadas a HIV). Esto es inaceptable, ya que la mayoría de los casos eran prevenibles (Organización Mundial de la Salud, 2013). Aunque algunas de las metas referentes al control de la TB establecidos en las ODM para el año 2015 se han alcanzado o están por alcanzarse, algunos aspectos del combate contra la TB siguen estando rezagados, como lo es la detección oportuna y tratamiento de los pacientes con TB-MDR y el desarrollo de métodos diagnósticos rápidos y confiables.

Desde 1994, el programa global de la OMS “Resistencia a Drogas Anti-Tuberculosas” ha estado colectando datos. Durante el período 2002-2007 se colectaron datos de 83 países. La prevalencia mediana de drogorresistencia a al menos un fármaco en los casos nuevos de TB fue de 11.1%, mientras que la prevalencia de TB-MDR varió de 0-22.3%, con las tasas más elevadas en los países de la Ex Unión Soviética. No se contó con datos de algunas regiones, en especial de África (Wright et al., 2009). El estudio concluyó que la TB-MDR continuaba siendo una amenaza en China y países de la región de la Ex Unión Soviética y enfatizó sobre la necesidad de desarrollar metodologías para una vigilancia epidemiológica más eficiente de la TB-MDR.

A nivel mundial, se estimó en 2008 que había 440 mil casos de TB-MDR. Esto corresponde a 3.6% (95% IC: 2.1-5.1%) de los casos y 20.2% (95% IC: 13.3-27.2%) de casos con tratamiento previo. Los niveles más elevados se encontraron en Europa del este y Asia central, donde en algunos países más del 20% de los casos nuevos y más del 50% de los casos con tratamiento previo tenían TB-MDR (Organización Mundial de la Salud, 2010). Se estima que en 2012 se presentaron 300 mil casos nuevos de TB-MDR pulmonar a nivel mundial. Más de la mitad de éstos se localizaron en India, China y Rusia (Organización Mundial de la Salud, 2013).

La OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reportaron un 19% de resistencia en México entre 1986 y 1990 (Laszlo y de Kantor, 1994; García-García et al., 1995; World Health Organization, 2006). Un estudio en Baja California reportó que la tasa de TB drogorresistente (TB-DR; resistente a un solo fármaco) es muy elevada (41%), y para TB-MDR entre 50 – 100 individuos (Peter et al., 1998).

Uno de los estudios más recientes sobre drogorresistencia en México, a nivel nacional, fue realizado en el periodo 2008-2009, en el que se realizó una encuesta representativa del país, colectando muestras en nueve estados de la República Mexicana), el análisis consistió en Pruebas de Sensibilidad Farmacológica (PSF) para drogas anti-tuberculosas. Se determinó que el 17.8% eran resistentes al menos a un fármaco y 2.8% TB-MDR, asociadas a tratamientos previos (RM 3.3) (Bojorquez-Chapela et al., 2013)

Los datos reportados más recientemente en México muestran un alarmante incremento en los casos de TB-DR, de 29 casos en el año 2000 a 257 casos en el 2013. Baja California se encuentra entre los estados considerados como de **alta prioridad** para el abatimiento de la TB-DR, presentando 95 casos del año 2010 a octubre de 2014 (Secretaría de Salud, 2014).

El incremento de cepas drogorresistentes de TB (TB-DR) es una situación preocupante a nivel mundial. La drogorresistencia en *M. tuberculosis* se debe principalmente a mutaciones en secuencias que codifican para 1) bloqueo de la actividad de un fármaco, 2) bloqueo en la activación de un pro-fármaco o 3) produce un enlace o destruye a la droga. Se han determinado mutaciones en genes que están asociadas a la resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea (H, R, Z, E y S) y de segunda línea (Ofx y Km) (Zenteno-Cuevas et al., 2009; Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010).

Las técnicas de secuenciación de genes han permitido asociar mutaciones en genes específicos de la micobacteria con la resistencia a fármacos. Sin embargo, es necesario realizar más estudios al respecto, ya que no en todos los casos estas mutaciones le confieren resistencia a la micobacteria o se han encontrado cepas resistentes que no presentan la mutación en cuestión (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010; Araya et al., 2011; Romay et al., 2012).

1.8.1 Mecanismos moleculares generadores de drogorresistencia a fármacos de primera línea.

Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas (2010) presentaron una revisión de los mecanismos moleculares de drogorresistencia a fármacos de primera línea (isoniacida, rifampicina, pirazinamida, estreptomina y etambutol), resumiendo la información en la Tabla I de su publicación.

1.8.1.1 Estreptomina (S)

La Estreptomina se descubrió en 1943, fue el primer fármaco con actividad antituberculosa probada, actúa específicamente en la forma extracelular de la micobacteria (Quirós-Roldán et al., 2001). El mecanismo de acción de este fármaco se basa en su unión al ARN ribosomal (ARNr) con lo cual inhibe la síntesis proteica de la bacteria. La resistencia a este fármaco se asocia con mutaciones en los genes *rpsL* y *rrS* (o *rrnS*), los cuales codifican respectivamente la síntesis de la subunidad proteica 12S y el ARNr 16S. El gen *rpsL* presenta mutaciones con mayor frecuencia, encontradas en los codones 43 (Lys→Arg y/o Thr) y 88 (Lys→Gln, Arg y/o Thr) (Caws y Drobniewski, 2001; Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010) (Tabla I). Al igual que ocurre con otros fármacos, se cree que existen mecanismos adicionales de resistencia a estreptomina, en este caso probablemente relacionados con la permeabilidad de la pared y membrana bacteriana, ya que el 30% de las cepas resistentes no muestran mutaciones en los genes *rrS* o *rpsL* (Quirós-Roldán et al., 2001).

1.8.1.2 Isoniacida (H)

La Isoniacida es un potente fármaco antituberculoso y bactericida que se utiliza contra la tuberculosis desde 1952 (Quirós-Roldán et al., 2001), actúa específicamente contra bacterias que se encuentran en fase de multiplicación activa (Said-Fernández et al., 2005). Su mecanismo de acción aún no está del todo aclarado, pero se sugiere que la isoniacida se transforma en su principio activo gracias a la enzima catalasa-peroxidasa, inhibiendo la síntesis de ácido micólico de la pared bacteriana, lo cual permite que el microorganismo sea susceptible a la acción de radicales reactivos de oxígeno y a otros elementos externos de respuesta del huésped (Quirós-Roldán et al., 2001; Said-Fernández et al., 2005) (Tabla I).

El gen *katG* codifica para la enzima catalasa-peroxidasa. La presencia de mutaciones o deleciones en este gen se ha relacionado con el 60% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a isoniacida (Caws y Drobniewski, 2001; Quirós-Roldán et al.,

2001). El gen *katG* tiene un tamaño de 1771 pares de bases (pb), no obstante del 30 al 65% de las mutaciones se localizan en el codón 315 Ser, el cual cambia a Thr, Asn o Arg (Kim et al., 2003; Said-Fernández et al., 2005); otras mutaciones de menor frecuencia se han reportado en los codones 300, 321, 418, 463, 501, 525, 587 y 700 (UniProtKB/Swiss-Prot; Mo et al., 2004) (Tabla I).

La segunda causa de resistencia a isoniacida se explica por mutaciones que afectan al gen *inhA* y con mayor frecuencia a su regulador (UniProtKB/Swiss-Prot; García Ramos et al., 2003), el cual codifica para la proteína *inhA*, responsable de la producción de ácidos grasos (Caws y Drobniewski, 2001; Quirós-Roldán et al., 2001); recientemente se ha propuesto a este gen como el responsable de la corresponsabilidad a isoniacida y etionamida (Said-Fernández et al., 2005). Las mutaciones en los genes *katG* e *inhA* están asociadas al 70-80% de los aislados resistentes a isoniacida (Said-Fernández et al., 2005); pero alrededor del 15-25% de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a este fármaco poseen el genotipo silvestre tanto en el gen *katG* como *inhA*, por lo cual se piensa debe existir otro mecanismo de resistencia (Quirós-Roldán et al., 2001). En este sentido, se ha observado que un 15% de las cepas resistentes a isoniacida presentan mutaciones en el locus *kasA*, lo cual implica que otro posible objetivo de la isoniacida es la proteína *kasA*, involucrada en el mecanismo de elongación de los ácidos grasos (Zhang et al., 2005). También se han reportado con menor frecuencia, mutaciones involucradas en la adquisición de resistencia a isoniacida en el gen *oxyR-ahpC* (Caws y Drobniewski, 2001; Wada et al., 2004).

1.8.1.3 Rifampicina (R)

La Rifampicina es otro fármaco importante, que debido a su fuerte actividad bactericida ha sido empleado desde 1970 (Quirós-Roldán et al., 2001), desafortunadamente su mala administración ha generado un incremento considerable en cepas resistentes (Said-Fernández et al., 2005). Respecto a su mecanismo de acción, la rifampicina se une a la ARN polimerasa de la micobacteria e interfiere durante el proceso de transcripción (Kocagoz et al., 2005). La RNA polimerasa es un complejo oligomérico compuesto por cuatro subunidades: α , β , β' y σ ; codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, respectivamente. Se ha demostrado que mutaciones en *rpoB* producen cambios conformacionales en la subunidad β de la RNA polimerasa, disminuyendo la afinidad por rifampicina y otorgando resistencia al fármaco (Said-Fernández et al., 2005) (Tabla I).

Pese a que el gen *rpoB* tiene un tamaño de 3534 pb, el 96 o 97% de las mutaciones que causan resistencia a rifampicina están localizadas en una región de 81pb entre los codones 507-533 y consisten por lo general en mutaciones puntuales no sinónimas (Kim et al., 2003; Wada et al., 2004; Kocagoz et al., 2005; Zhang et al., 2005). De acuerdo con los resultados de diversos estudios, en el 40 al 70% de los aislados, se observaron mutaciones puntuales en el codón 531 Ser por Leu o por Thr; del 32 al 36% de las cepas estudiadas mostraron cambios en el codón 526 His; y del 7 al 9% en el codón 516 Asp (Marín et al., 2004; Kocagoz et al., 2005)(Kocagoz et al.,2005; Marín et al.,2004). También se han reportado mutaciones o deleciones de menor frecuencia en otros codones como: 498, 511-518, 524–527, 456, 531, 533 (UniProtKB/Swiss-Prot) (Tabla I). En los últimos años se han observado algunos aislados resistentes cuya mutación no se localiza en la región de 81pb, por lo cual se propone la existencia de mecanismos adicionales generadores de resistencia (Zenteno-Cuevas et al., 2009).

Las cepas resistentes a rifampicina presentan resistencia cruzada a drogas químicamente relacionadas o con sitios de acción similares dentro de la célula, como rifapentina y parcialmente a rifabutina y rifalacina (Somoskovi et al., 2001). Finalmente, el diagnóstico de resistencia a rifampicina es especialmente importante debido a su fuerte asociación con la resistencia a isoniacida, considerándose como un marcador importante de TB-MDR (Quirós-Roldán et al., 2001).

1.8.1.4 Etambutol (E)

El Etambutol es otro fármaco empleado en contra de TB, se utilizó por primera vez en 1961, tiene actividad bacteriostática, es un buen antimicobacteriano y sólo actúa contra bacterias en fase de multiplicación activa (Quirós-Roldán et al., 2001). Se recomienda para tratar infecciones diseminadas con bacterias pertenecientes al complejo *M. avium*, especialmente en personas infectadas con VIH, que cursan con Diabetes Mellitus, o con antecedentes de abandono o recaída. La probabilidad de resistencia es más baja que con otras drogas, por lo cual se incluye en la pauta básica de tratamiento primario en los países con una tasa elevada de resistencia primaria a otro fármaco de primera línea (Organización Mundial de la Salud, 2010).

El mecanismo de acción de este medicamento no ha sido claramente definido; se cree que está relacionado con la interferencia en el metabolismo del ARNr, la síntesis de fosfolípidos, la síntesis de ácido micólico y la síntesis de polisacáridos de la pared celular bacteriana (Quirós-Roldán et al., 2001). Evidencias experimentales y

clínicas indican que el etambutol ejerce un efecto sinérgico con otros fármacos antituberculosos como consecuencia del incremento en la permeabilidad bacteriana, permitiendo el ingreso en mayor cantidad de otros medicamentos (Said-Fernández et al., 2005).

La resistencia a etambutol está asociada a mutaciones en tres genes: *embA*, *embB*, y *embC* localizados en un locus de 10,000pb (*embABC*), que codifican para la enzima arabinosiltransferasa, relacionada con la síntesis de polímeros de arabinosa y galactosa de la pared celular. Cerca del 70% de las cepas resistentes a etambutol presentan una mutación puntual en el codón 306 Met del gen *embB*, causando la sustitución por Val, Leu o Ile (Sreevatsan et al., 1997b). Otras mutaciones reportadas se encuentran en los codones 297, 306, 328, 330, 334, 406, 497, 745, 959, 1000 y 1024 (UniProtKB/Swiss-Prot).

1.8.1.5 Pirazinamida (Z)

El empleo de la pirazinamida se inició en el año de 1952, funciona específicamente contra bacilos semiláteros que no son afectados por ningún otro medicamento antituberculoso. Una de sus principales ventajas es que disminuye el tiempo de tratamiento, debido a su sinergia con isoniacida y rifampicina; sin embargo, su principal desventaja radica en su alta especificidad en contra de *M. tuberculosis*, de manera que si la cepa infectante es diferente, como pudiera ser *M. bovis*, el tratamiento no es efectivo (Said-Fernández et al., 2005).

Respecto a su mecanismo de acción, la pirazinamida es transformada por la enzima pirazinamidasa a su principio activo, ácido pirazinóico, el cual genera un pH ácido intrabacteriano, al parecer causante del efecto contra *M. tuberculosis* (Zhang y Mitchison, 2003) (Tabla I). La pirazinamidasa es codificada por el gen *pncA*, mutaciones en este gen explican el 80% de las cepas resistentes a este fármaco (Quirós-Roldán et al., 2001). Para el caso particular de *M. bovis*, en el codón 57 del gen *pncA*, se ha identificado una mutación puntual (C→G) que resulta en la sustitución de His por Asp, suficiente para inactivar la enzima pirazinamidasa (Zhang y Mitchison, 2003; Said-Fernández et al., 2005).

HIPÓTESIS

Baja California es uno de los estados considerados de alta prioridad para la tuberculosis drogorresistente y además existe una alta diversidad genética en las cepas circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* en este estado, por lo que se espera que las mutaciones en los genes asociados a fármacos de primera línea en cepas de *M. tuberculosis* sean similares a los previamente reportados en regiones de alta prioridad para la tuberculosis drogorresistente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterizar las mutaciones presentes en genes asociados a drogorresistencia en los cinco fármacos de primera línea (rifampicina, isoniacida, pirazinamida, estreptomina y etambutol) en aislados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de Baja California.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar las mutaciones presentes en los genes asociados a drogorresistencia contra fármacos de primera línea, inhA y katG (isoniacida) rpoB (rifampicina), pncA (pirazinamida), rpsL y rrS (estreptomina) y embB (etambutol), en aislados de *M. tuberculosis* drogorresistente provenientes de Baja California.
2. Determinar la asociación entre la drogorresistencia detectada por características fenotípicas (sensibilidad farmacológica) y moleculares (mutaciones) en los aislados de *M. tuberculosis* drogorresistentes de Baja California.
3. Determinar la asociación entre los linajes por MIRU-VNTR 12 loci y las mutaciones en genes asociados a drogorresistencia contra los cinco fármacos de primera línea.
4. Determinar la asociación entre las características epidemiológicas y moleculares (linajes y mutaciones identificadas en los genes analizados) de aislados de *M. tuberculosis* drogorresistentes de Baja California.

3 MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Población de estudio y obtención de muestras

Estudio cuantitativo, descriptivo, analítico transversal. Se analizó a la población que acudió a la Clínica de Tuberculosis (CTBT) del Hospital General de Tijuana, que fue diagnosticada con tuberculosis durante el periodo de Octubre de 2009 a Abril de 2011.

Se colectaron 211 muestras clínicas, correspondientes al mismo número de pacientes diagnosticados con tuberculosis. La información clínica y sociodemográfica del paciente se obtuvo a partir del expediente clínico y de la información existente en la Plataforma Única de Tuberculosis de la Secretaría de Salud (Anexo 1) . Este proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital General de Tijuana. Se mantuvo la confidencialidad y protección de la información obtenida en todos y cada uno de los casos, en cumplimiento del artículo décimo séptimo de los lineamientos generales de protección de datos personales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 30 de Septiembre de 2005. A todas las muestras clínicas se les realizó el análisis bacilosκόpico, el cultivo microbiológico y el análisis molecular correspondiente. A las muestras de pacientes con sospecha clínica de TB-DR se les realizó la prueba de sensibilidad a fármacos mediante la prueba denominada "Mycobacteria Growth Indicator Tube" (MGIT) para determinar el perfil de drogorresistencia de las cepas.

3.1.1 Criterios de inclusión

De los 211 aislados obtenidos, solo se analizaron aquellos que cumplieron con los siguientes criterios:

1. Haber sido identificado molecularmente como *M. tuberculosis*, eliminando los aislados de *M. bovis*.
2. Contar con productos de amplificación de por lo menos los genes *rpoB* (asociado a resistencia para R), *inhA* y *katG* (asociados a resistencia para H).
3. Contar con datos epidemiológicos del paciente.
4. Ser fenotípicamente drogorresistente para al menos uno de los fármacos de primera línea (R,H,Z,E,S) en la prueba de sensibilidad (MGIT).

3.2 Análisis microbiológico

Este análisis se realizó en la CTBT, el cual cuenta con las instalaciones de Bioseguridad Nivel III (BSL3). Las muestras positivas de la baciloscopía se cultivaron por duplicado en cultivo Löwenstein-Jensen (L-J), incluyendo la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv como control positivo. Las muestras fueron descontaminadas previamente con el método de Petroff (Koneman et al., 1997). Se tomó de 0.5 – 1.0 mL de esputo adicionando NaOH para lograr una concentración del 1%, posteriormente se centrifugó a 3,000 x g por 15 min. El sedimento fue reconstituido hasta llegar a 2.5 mL con buffer de fosfato pH 6.8, posteriormente se inoculó por duplicado en el medio L-J. Se incubaron a 37 °C y se realizaron observaciones una vez por semana durante ocho semanas, tomando nota del tiempo en que se desarrollaron en el medio L-J. Cuando se presentó crecimiento bacteriano, se tomaron de 1 a 2 colonias y se colocaron en tubos de 1.5 mL herméticamente cerrados y fueron transportados bajo condiciones de seguridad y en red de frío al LEEM, el cual cuenta con las instalaciones de Bioseguridad Nivel III (BSL3) donde se realizó el análisis molecular correspondiente.

3.2.1 Pruebas de sensibilidad

A los pacientes con sospecha clínica de TB-DR se les realizó la prueba de sensibilidad a fármacos de primera línea (H, R, Z, S y E), utilizando el sistema MGIT (BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System) en la CTBT.

3.3 Análisis Molecular

El análisis molecular se desarrolló en cuatro etapas:

- 1) Extracción de DNA
- 2) Identificación molecular para diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*
- 3) Determinación de linajes por MIRU-VNTR 12
- 4) Determinación de mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para fármacos de primera línea.

3.3.1 Extracción de ADN

Se tomaron dos colonias de *M. tuberculosis* y se homogenizaron con 100 µL solución de lisis (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl). Se incubó 15

min a 95 °C, después se centrifugó por 10 min a 6,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL limpio y etiquetado (Yugueros-Marcos et al., 1999). Por último, el DNA extraído fue almacenado a -20 °C hasta su posterior análisis. La calidad y cantidad del DNA se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1.4% a 100 mV por 30 min teñidos con Gelstar (Cambrex®). Se utilizó una regla molecular como referencia para evaluar la concentración del DNA obtenido (Mass Ruler low range DNA Ladder, Fermentas, USA).

3.3.2 Identificación molecular de especies

Con el objetivo de identificar la especie de micobacteria, las muestras de DNA fueron analizadas mediante la amplificación de una región del operón *mce-3* (mammalian cell- entry 3, por sus siglas en inglés). La identificación molecular consistió en la amplificación de un fragmento de 262 pb que corresponde a la especie de *M. tuberculosis* y un fragmento de 168 pb correspondiente a *M. bovis* (Bakshi et al., 2005, 2007). La amplificación se realizó mediante una PCR multiplex (mPCR), utilizando tres cebadores, un cebador cadena arriba (forward) para ambas especies y dos cadena abajo (reverse) específicos para cada especie (cebador cadena arriba CSB1: 5'-TTCCGAATCCCTTGTGA-3'; cebador cadena abajo específico para *M. bovis* CSB2: 5'-GGAGAGCGCCGTTGTA-3'; y cebador cadena abajo específico para *M. tuberculosis* CSB3: 5'-AGTCGCCGTGGCTTCTCTTTTA-3'). Las condiciones de la reacción se realizaron de acuerdo a las especificaciones del autor (Bakshi et al., 2005, 2007) con algunas modificaciones.

El volumen final de la reacción fue 10 µL, constituida de 5 a 20 ng de DNA, 0.4X de Buffer (Apex), 0.8 mM dNTP's, 1.5 mM MgCl₂ (Apex), 0.40 µM de cada cebador, 1X de BSA (BioLab), 0.05 U *Taq* DNA polimerasa (SIGMA®). El perfil de temperatura fue de un ciclo de 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 52.3 °C por 1.5 min y 72 °C por 1 min y un ciclo final de 72 °C por 10 min. En todas las reacciones se incluyó la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG como controles positivos y como control negativo agua nanopura grado molecular. La calidad y cantidad de los productos amplificados se determinó en geles de agarosa al 2% a 100 mV por 30 min, teñidos con Gelstar (Cambrex®). Para la identificación del tamaño del fragmento amplificado se utilizó una regla molecular (Mass Ruler low range DNA Ladder, Fermentas, USA). Para el presente estudio, se tomaron únicamente los aislados confirmados como *M. tuberculosis*.

3.3.3 Determinación de linajes por MIRU-VNTR 12

La información de los linajes se obtuvo de lo reportado por García-Ortiz (2013) con 12 loci MIRU-VNTR.

3.3.4 Caracterización de mutaciones en genes asociadas a drogorresistencia para fármacos de primera línea.

Con el objetivo de identificar las mutaciones presentes en los genes asociados a drogorresistencia contra los fármacos de primera línea de los aislados clínicos identificados molecularmente como *M. tuberculosis*, se amplificaron los genes *inhA* y *katG* (H), *rpoB* (R), *pncA* (Z), *rpsL* y *rrs* (S) y *embB* (E). Se tomó como referencia la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (American Type Culture Collection 27294), la cual es sensible a los cinco fármacos antituberculosos de primera línea, considerando como mutación cualquier diferencia en la secuencia de nucleótidos que se presentara en los aislados respecto a ésta.

3.3.4.1 Amplificación de genes asociados a resistencia a fármacos

Para la estandarización de la reacción de PCR de punto final de los cinco genes asociados a la drogorresistencia se establecieron las siguientes condiciones: 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.0 (4µL), 25 mM MgCl₂ (1µL), 10 mM dNTPs (0.6µL), 10µM de cada oligonucleótido, 1U de enzima *Taq* polimerasa (0.2µL) (Fermentas), 5% de glicerol, 100 ng de ADN cromosomal de cada cepa y agua libre de nucleasas para llevar a volumen final de 20 µL. El perfil de temperatura consistió en 1 ciclo a 95 °C por 5 min; 5 ciclos de 95 °C por 15 s, 68 °C por 5 s y 72 °C por 20 s; 5 ciclos de 95 °C por 15 s, 64 °C por 5 s y 72 °C por 20 s; y 25 ciclos de 94 °C por 15 s, 62 °C por 5 s y 72 °C por 20 s, seguido de un paso final de elongación a 72 °C por 5 min.

Los productos amplificados de cada gen se purificaron utilizando ExoSap (USB), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para comprobar la presencia de los productos purificados y conocer su concentración se realizó una nueva electroforesis con un marcador de peso molecular para cuantificación (MassRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use, 80-1031 bp, Fermentas). Los productos se enviaron a SeqXcel Inc. en San Diego, California, EUA, para ser amplificadas utilizando nucleótidos terminadores de secuencia (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) y procesados en un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Automated Capillary DNA sequencer, Applied Biosystems).

3.3.5 Análisis de mutaciones

La revisión y edición de los espectroferogramas (cromatogramas) de secuenciación obtenidos a partir de la amplificación de cada uno los genes de resistencia analizados se realizó con el software CodonCode Aligner versión 5.1.1 (CodonCode Corporation, 2015). La alineación, análisis y traducción a aminoácidos de las secuencias se realizó con el programa Mega versión 6 (Tamura et al., 2013), en donde se verificó el cambio de base en los aislados que presentaron mutaciones en función del espectroferograma en sentidos 5'-3' y 3'-5'.

De las secuencias traducidas a aminoácidos, se identificaron las mutaciones sinónimas y no sinónimas y se determinó la frecuencia de aparición de cada una de ellas. Se compararon con las secuencias respectivas a cada gen de la cepa de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, con los números de identificación del Gen Bank mostrados en la (Tabla I. Genes que se asocian a drogorresistencia contra fármacos antituberculosos, sus abreviaturas, números de acceso en la base de datos de "GeneBank" (Gene ID), cebadores utilizados para su amplificación y tamaño del fragmento amplificado en pares de bases (pb), para la cepa de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)). Finalmente, de acuerdo a las mutaciones detectadas para cada uno de los genes analizados, los aislados se clasificaron según el grado de drogorresistencia como sigue:

- **TB-DR:** Tuberculosis drogorresistente (resistente un solo fármaco de primera línea)
- **TB-PR:** Tuberculosis polirresistente, resistente a dos o más fármacos, que no sean H+R.
- **TB-MDR:** Tuberculosis multidrogorresistente (resistente al menos a H+R).
- **TB-XDR:** Tuberculosis extremadamente resistente (TB-MDR y resistente además al menos a una fluoroquinolona y a uno o más de los fármacos inyectables de segunda línea-kanamicina, amicacina y capreomicina).

Cabe mencionar que no se contó con la información necesaria para clasificar molecularmente a los aislados como TB-XDR, ya que no se amplificaron genes asociados a drogorresistencia para los fármacos inyectables de segunda línea.

Tabla I. Genes que se asocian a drogorresistencia contra fármacos antituberculosos, sus abreviaturas, números de acceso en la base de datos de “GeneBank” (Gene ID), cebadores utilizados para su amplificación y tamaño del fragmento amplificado en pares de bases (pb), para la cepa de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Fármaco relacionado	Abreviatura	Gen	Gene ID	Cebadores	Tamaño
Rifampicina	R	<i>rpoB</i>	888164	5' AGCGGATGACCACCCAGGAC 3' 3' TCAGGGGTTTCGATCGGGCA 5'	265pb
Isoniacida	H	<i>katG</i>	885638	5' GCAGATGGGGCTGATCTACG 3' 3' AACTCGTCGGCCAATTCCTC 5'	555pb
		<i>inhA</i>	886523	5' AGGTCGCCGGGGTGGTCAGC 3' 3' AGCGCCTTGGCCATCGAAGCA 5'	517pb
Pirazinamida	Z	<i>pncA</i>	888260	5' GGCATCATGGACCCTATATC 3' 3' CAACAGTTCATCCCGGTTTC 5'	670pb
Estreptomycin	S	<i>rpsL</i>	888259	5' GTCAAGACCGCGGCTCTGAA 3' 3' TTCTTGACACCCTGCGTATC 5'	272pb
		<i>rrs</i>	2700429	5' AAACCTCTTTCACCATCGAC 3' 3' CAGGTAAGTTCTTCGCGTTG 5'	552pb
Etambutol	E	<i>embB</i>	886126	5' CGGCATGCGCCGGCTGATTC 3' 3' TCCACAGACTGGCGTCGCTG 5'	260pb

3.4 Análisis epidemiológico molecular

La información sociodemográfica, clínica y molecular de los pacientes permitió construir una matriz de 17 variables, clasificadas en tres grupos:

Variables sociodemográficas:

1. Sexo
2. Edad
3. Lugar de nacimiento
4. Lugar de residencia
5. Tiempo viviendo en el lugar de residencia
6. Escolaridad

Variables clínicas:

1. Año de diagnóstico
2. Esquema de tratamiento
3. Tiempo de tratamiento
4. Tipo de ingreso
5. Tipo de egreso
6. Baciloscopía
7. Localización de la TB
8. Enfermedades asociadas
9. Sensibilidad farmacológica de la cepa

Variables moleculares:

1. Linaje (MIRU-VNTR 12)
2. Mutaciones en genes asociadas a drogorresistencia para H, R, Z, S y E.

Las variables relacionadas con la drogorresistencia (sensibilidad farmacológica y mutaciones en genes asociados a drogorresistencia) fueron a su vez clasificadas según el grado de drogorresistencia (Tabla II).

Tabla II. Clasificación de acuerdo al grado de drogorresistencia farmacológica y molecular (Secretaría de Salud, 2013).

Grado de drogorresistencia	Sensibilidad farmacológica	Drogorresistencia molecular	Descripción
Sin drogorresistencia	Sensible	Sin mutación	No presenta drogorresistencia o mutaciones en los genes asociados a fármacos de primera línea
Drogorresistente o monorresistente	TB-DR	TB-DR	Presenta drogorresistencia farmacológica o alguna mutación en un gen asociado a drogorresistencia para un fármaco de primera línea
Polirresistente	TB-PR	TB-PR	Presenta drogorresistencia farmacológica o alguna mutación en genes asociados a drogorresistencia para al menos dos fármacos de primera línea, que no sean H + R
Multidrogorresistente o multifarmacorresistente	TB-MDR	TB-MDR	Presenta drogorresistencia farmacológica o mutaciones en genes asociados a drogorresistencia para al menos H + R
Ultradrogorresistente o con resistencia extendida	TB-XDR	TB-XDR	Cepa TB-MDR y drogorresistente a una Fq y a uno o más de los fármacos inyectables de segunda línea: kanamicina, amicacina y capreomicina.

Se determinaron razones de momios (RM) para los grupos de drogorresistencia contra las variables sociodemográficas y clínicas para determinar asociaciones.

Tabla III. Tabla tetracórica para el cálculo de razones de momios (RM).

	Resultado o Consecuencia		TOTALES
	Negativo	Positivo	
Con la condición	A	B	A + B
Sin la condición	C	D	C + D
TOTALES	A + C	B + D	A + B + C + D

Los datos de la Tabla III se utilizaron para el cálculo de la razón de momios (RM), con el objeto de evaluar la asociación entre las variables sociodemográficas y clínicas, con la sensibilidad farmacológica y variables moleculares (drogorresistencia y linajes).

Ecuación 1. Cálculo de razón de momios (RM)

$$RM = \frac{A/B}{C/D} = \frac{A \times D}{C \times B}$$

Ecuación 2. Cálculo de error estándar del logaritmo natural de la RM

$$SE\{\ln(RM)\} = \sqrt{\frac{1}{A} + \frac{1}{B} + \frac{1}{C} + \frac{1}{D}}$$

Ecuación 3. Cálculo del límite inferior y superior del intervalo de confianza al 95%

$$IC\ 95\% \text{ (límite inferior)} = \exp(\ln(RM) - 1.96 \times SE\{\ln(RM)\})$$

$$IC\ 95\% \text{ (límite superior)} = \exp(\ln(RM) + 1.96 \times SE\{\ln(RM)\})$$

Cuando alguno de los valores de la Tabla III era cero, se sumó 0.5 a los valores *A*, *B*, *C* y *D*, para evitar los cálculos indeterminados, según la metodología descrita por Pagano y Gauvreau (2000).

Además del cálculo del intervalo de confianza, se calculó la significancia estadística ($P < 0.05$) por medio de una prueba chi cuadrada para cada caso.

4 RESULTADOS

4.1 Población de estudio

Solo 33 (15.6%) aislados cumplieron con los criterios de inclusión establecidos.

4.2 Características sociodemográficas

4.2.1 Sexo y Edad

La distribución por sexos fue como sigue: 27 hombres (81.8%), 6 mujeres (18.2%). La razón hombre/mujer fue de 5:1.

La edad promedio de la muestra de estudio (n=33) fue de 40 años (ds±12.8), siendo el paciente más joven de 15 y el de mayor edad de 70 años. La edad promedio de los hombres fue mayor que el de las mujeres, siendo de 42 (ds ±12.8) y 34 (ds ±12) respectivamente (Tabla IV).

Para evaluar la distribución por edades en la muestra de estudio, se clasificaron en seis grupos de edad, como sigue:

- 1) menores a 25 años
- 2) de 25 a 29 años
- 3) de 30 a 39 años
- 4) de 40 a 49 años
- 5) de 50 a 59 años
- 6) mayores a 59 años

El mayor porcentaje de individuos se encontró en el grupo de edades entre 40 y 49 años (32.4%, 11 casos) y el menor porcentaje en los mayores a 60 años (5.9%, 2 casos). (Figura 1).

La razón hombre:mujer presentó una variación notoria entre los diferentes grupos de edad, siendo de hasta 10:1 en el grupo de edad con mayor número de casos(40-49 años) y de tan solo 1:2 en edades menores a 25 años. No hubo mujeres en los grupos de edad de 25 a 29 años y en el de mayor a 60 años. En general, hubo una tendencia hacia menores edades en las mujeres que en los hombres (Tabla IV, Figura 1).

Tabla IV. Datos sociodemográficos de pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis* analizados en este estudio.

AISLADO	SEXO	EDAD	LN	LR	AÑOS EN LR	ESCOLARIDAD
C020	H	27	BCS	BCS	ND	Secundaria
C022	H	47	SINALOA	BC	> 5	Primaria
C023	M	37	CHIAPAS	BC	1-5	Secundaria
C031	H	42	BC	BC	> 5	Secundaria
C032	H	15	BC	BC	< 1	Primaria
C034	H	40	JALISCO	BC	< 1	Preparatoria
C035	H	70	DURANGO	BC	> 5	Primaria
C036	H	26	BC	BC	< 1	Profesional
C038	H	65	JALISCO	BC	1-5	Secundaria
C046	H	46	BC	BC	> 5	Preparatoria
C057	H	36	BC	BC	> 5	Preparatoria
C062	M	45	MICHOACÁN	BC	< 1	Primaria
C067	H	59	BC	BC	> 5	Secundaria
C075	M	30	BC	BC	1-5	Profesional
C078	H	32	BC	BC	> 5	Secundaria
C169	H	41	MÉXICO	BC	1-5	Secundaria
C171	M	21	BC	BC	> 5	Secundaria
C172	H	34	GUANAJUATO	BC	ND	Sin escolaridad
C175	H	47	SINALOA	BC	< 1	Primaria
C176	M	50	GUERRERO	BC	< 1	Primaria
C177	H	48	BC	BC	> 5	Primaria
C181	H	52	JALISCO	BC	1-5	Primaria
C183	H	32	OAXACA	BC	> 5	Primaria
C184	H	50	DF	BC	< 1	ND
C191	H	51	VERACRUZ	BC	< 1	Primaria
C193	H	34	GUERRERO	BC	< 1	Secundaria
C194	H	32	BC	BC	> 5	Secundaria
C201	H	56	CHIHUAHUA	BC	< 1	Secundaria
C203	H	29	BC	BC	> 5	Profesional
C204	H	42	BC	BC	1-5	de tres a 5 años
C205	H	26	BC	BC	ND	Preparatoria
C206	H	43	BC	BC	ND	Primaria
C211	M	22	Sonora	Sonora	> 5	Profesional

Abreviaturas: H: Hombre; M: Mujer; LN: Lugar de nacimiento; LR: Lugar de residencia; BC: Baja California; BCS: Baja California Sur; ND: No determinado.

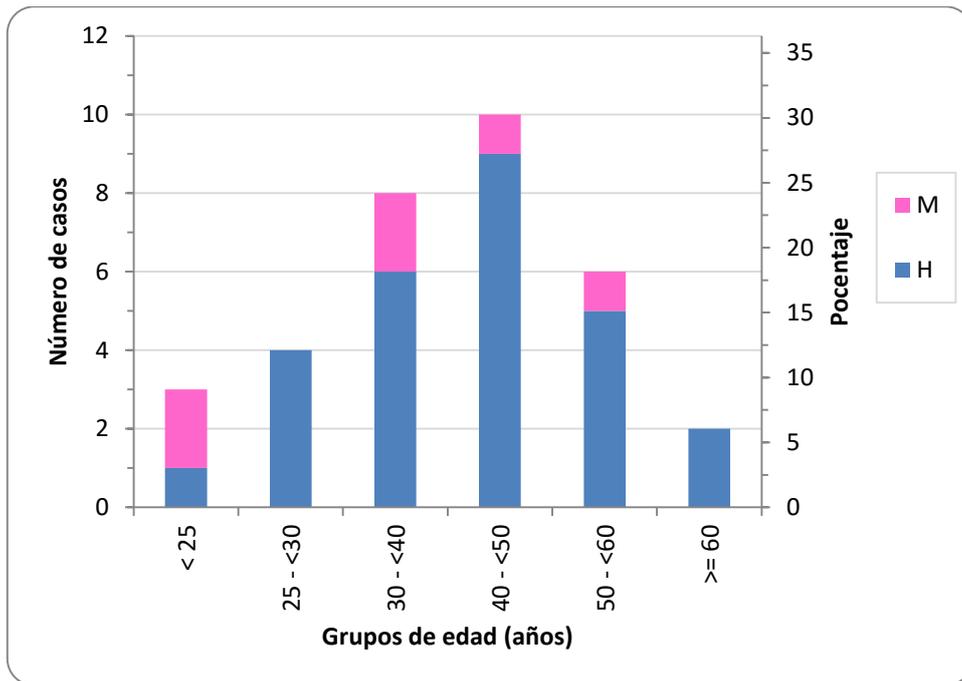


Figura 1. Número de casos de la muestra de estudio clasificados por grupo de edad y sexo. (n=33; H: hombre; M: mujer).

4.2.2 Lugar de nacimiento y lugar de residencia

En cuanto al lugar de nacimiento, 19 pacientes nacieron fuera de Baja California, (54.5%), y solo 15 pacientes (45.5%) nacieron en Baja California (BC) (Figura 2).

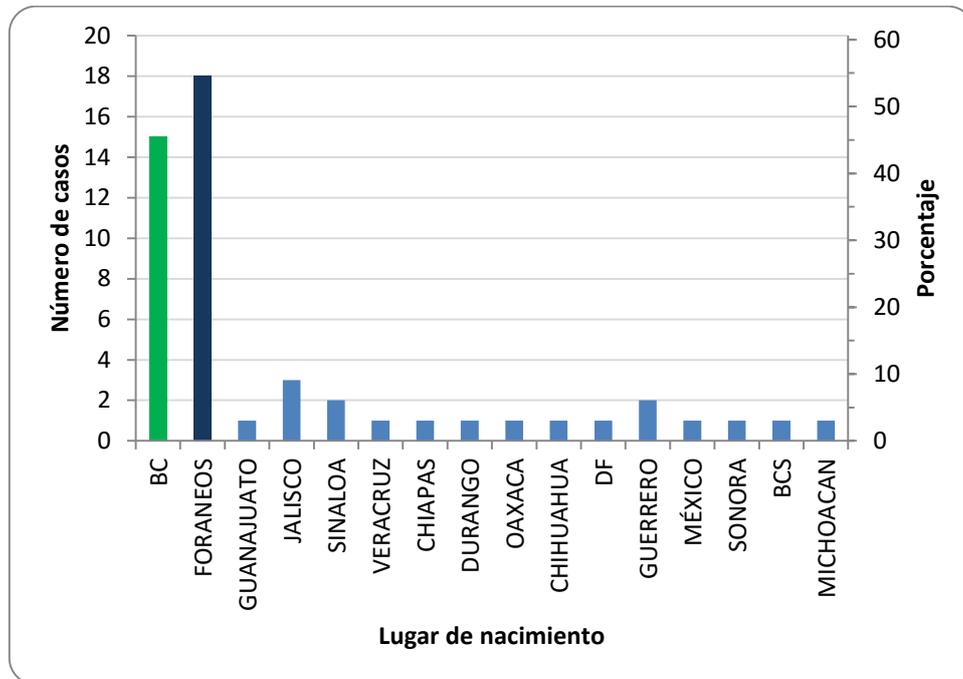


Figura 2. Número de casos de la muestra de estudio de acuerdo al lugar de nacimiento (n=33). Barra en azul oscuro indica la sumatoria de todos los casos foráneos a Baja California (BC). En azul claro se muestra la misma información por estado, sin incluir BC (BCS: Baja California Sur; DF: Distrito Federal)

La mayoría de los pacientes de la muestra de estudio declararon residir en Baja California (31 casos, 93.9%) y solo 2 pacientes fueron de residencia foránea (6%) (Figura 3). El tiempo radicando en el lugar de residencia fue mayor a 5 años para el 39.4% de los casos, de 1 a 5 años para el 18.2% y menor a 1 año para el 30.3%, aunque no se contó con esta información para 12.1% de los casos (Figura 3).

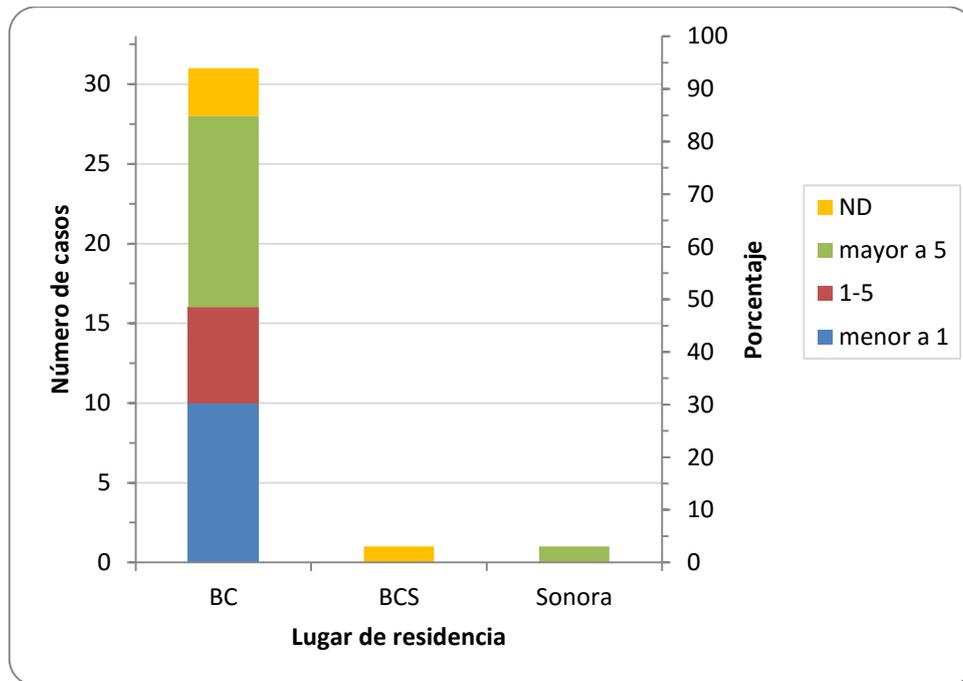


Figura 3. Número de casos de la muestra de estudio de acuerdo al lugar de residencia y años viviendo en el mismo (n=33; ND: No determinado, BC: Baja California, BCS: Baja California Sur).

4.3 Características clínicas

Las variables clínicas que se incluyeron en el análisis de la muestra de estudio fueron las siguientes: 1) año de diagnóstico, 2) baciloscopia, 3) localización de la TB, 4) tipo de ingreso, 5) esquema de tratamiento, 6) tiempo de tratamiento, 7) tipo de egreso y 8) comorbilidades (Tabla V)

Tabla V. Datos clínicos de pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis* drogoresistente analizados en este estudio.

AISLADO	AÑO DX	BK	LOCALIZACIÓN TB	INGRESO	ESQUEMA TX	TIEMPO TX (meses)	EGRESO	COMORBILIDAD
C020	2008	BK+++	Pulmonar	Nuevo	Segunda L.	26	Curado	Ninguna
C022	2009	BK+	Pulmonar	Reingreso	Primario	12	Abandono	Ninguna
C023	2009	BK++	Pulmonar	Referido	Segunda L.	18	Curado	Ninguna
C031	2006	BK+	Pulmonar	Recaída	Retrat.	6	Defunción	Diabetes
C032	2010	BK+	Pulmonar	Recaída	Retrat.	6	Defunción	Alcoholismo
C034	2010	BK+	Pulmonar	Recaída	Retrat.	6	Defunción	Diabetes
C035	2008	BK+++	Pulmonar	Nuevo	Segunda L.	48	Curado	Diabetes
C036	2008	BK+	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Abandono	VIH-Sida
C038	2009	BK++	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Fracaso	Diabetes
C046	2008	BK+++	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Curado	Ninguna
C057	2010	BK+++	Pulmonar	Recaída	Primario	6	Defunción	Ninguna
C062	2009	ND	Pulmonar	Nuevo	Primario	7	Termino Tx	Ninguna
C067	2010	BK+++	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Curado	Ninguna
C075	2010	BK++	Pulmonar	Reingreso	Continua Tx	12	Curado	Ninguna
C078	2009	BK+	Pulmonar	Recaída	Retrat.	6	Abandono	Drogas
C169	2010	BK+	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Abandono	Otra
C171	2010	BK+	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Curado	Desnutrición
C172	2010	BK+	Pulmonar	Nuevo	Primario	12	Curado	Diabetes
C175	2010	BK+	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Curado	VIH-Sida
C176	2010	BK+++	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Curado	Ninguna
C177	2010	BK+	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Abandono	Ninguna
C181	2010	BK+++	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Curado	Alcoholismo
C183	2010	BK+++	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Abandono	Ninguna
C184	2010	BK++	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Curado	Ninguna
C191	2010	BK+	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Curado	Diabetes
C193	2010	BK+++	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Curado	Ninguna
C194	2010	BK+++	Pulmonar	Nuevo	Segunda L.	24	Curado	Alcoholismo
C201	2011	BK+++	Pulmonar	Reingreso	Retrat.	7	Curado	Ninguna
C203	2010	BK+++	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Curado	Ninguna
C204	2011	BK+	Pulmonar	Recaída	Primario	2	Abandono	VIH-Sida
C205	2010	BK+	Pulmonar	Fracaso	Segunda L.	25	Curado	Ninguna
C206	2010	ND	Pulmonar	Nuevo	Primario	0	Defunción	Diabetes
C211	2010	BK+	Pulmonar	Nuevo	Primario	6	Fracaso	Sx. Antifosfolípido

Abreviaturas: Dx: Diagnóstico; Tx: Tratamiento; BK: Baciloscopia; Sx: Síndrome;

Localización de la tuberculosis, año de diagnóstico y baciloscopia

En todos los casos la infección fue pulmonar (Tabla V).

Los pacientes incluidos en la muestra de estudio fueron diagnosticados entre los años 2005 y 2011, con una mayor frecuencia en el 2010 (63.6% de los casos) y una desviación estándar 1.5 (Figura 4).

Se registraron tres casos anteriores a 2008, dos en 2005 (aislados C020 y C023), y uno en 2006 (aislado C031), todos registrados como TB-MDR, al haberse detectado drogorresistencia para los cinco fármacos de primera línea para los aislados C020 y C031, y drogorresistencia para H, R, S y E para el aislado C023 mediante la prueba MGIT 960 (Tabla V).

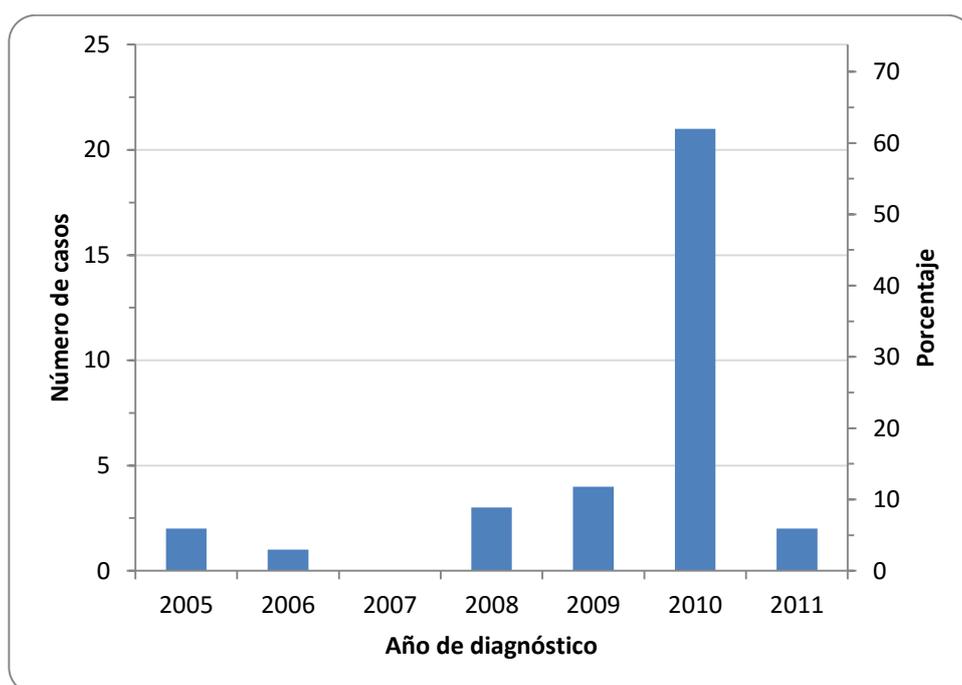


Figura 4. Número de casos de la muestra de estudio de acuerdo al año de diagnóstico (n=33; ds=1.5).

La abundancia de bacterias en la baciloscopía se registró de BK+ a BK+++. La mayoría de los casos fueron BK+ (15, 45.5%), seguido de BK+++ (12, 36.4%), y por último BK++ (4, 12.1%), aunque no se contó con esta información para 2 de los casos (6.1%) (Tabla V, Figura 5).

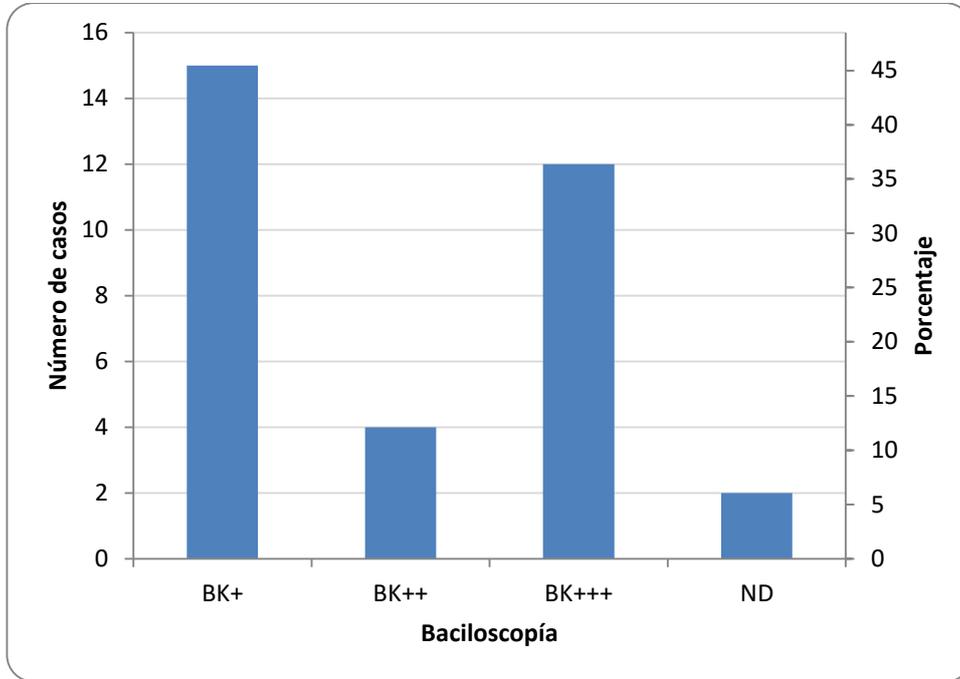


Figura 5. Número de casos de la muestra de estudio de acuerdo a la baciloscopía (n=33).

4.3.1 Tratamiento

En cuanto al tratamiento de los pacientes, se analizaron cuatro variables: 1) tipo de ingreso, 2) esquema de tratamiento, 3) tiempo de tratamiento y 4) tipo de egreso.

4.3.1.1 Tipo de ingreso

El tipo de ingreso se clasificó en: 1) caso nuevo, 2) reingreso, 3) referido, 4) recaída y 5) fracaso. La mayoría de los casos fueron casos nuevos (22, 66.7%), seguido de recaídas (7, 21.2%), reingresos (3, 9.1%) y por último fracasos (1 caso, 3%). El único ingreso como fracaso fue un hombre (Figura 6).

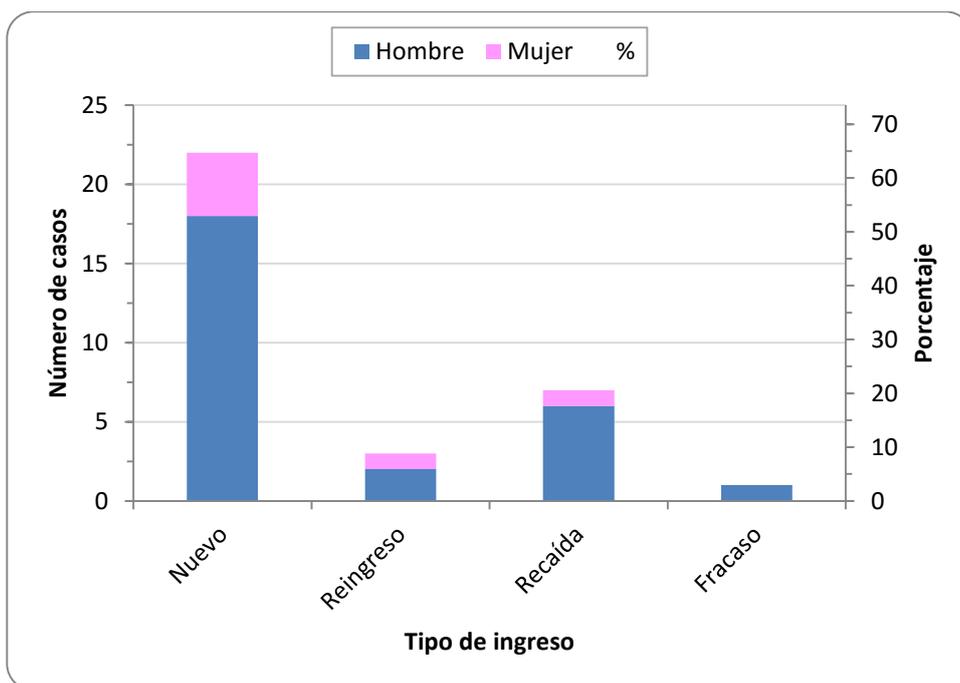


Figura 6. Número de casos según el tipo de ingreso y sexo del paciente (n=33).

4.3.1.2 Esquema de tratamiento

El esquema de tratamiento se clasificó en: 1) primario, 2) continúa en tratamiento, 3) retratamiento y 4) segunda línea (Tabla V)

Tabla V La mayoría de los pacientes recibieron tratamiento primario (22 casos, 66.7%), seguido de tratamiento con fármacos de segunda línea y retratamientos (5 casos, 15.2% cada uno), y por último, continúa en tratamiento (1 casos, 3%). No hubo mujeres que recibieran retratamiento, así como hombres en la categoría de continúan en tratamiento (Figura 7).

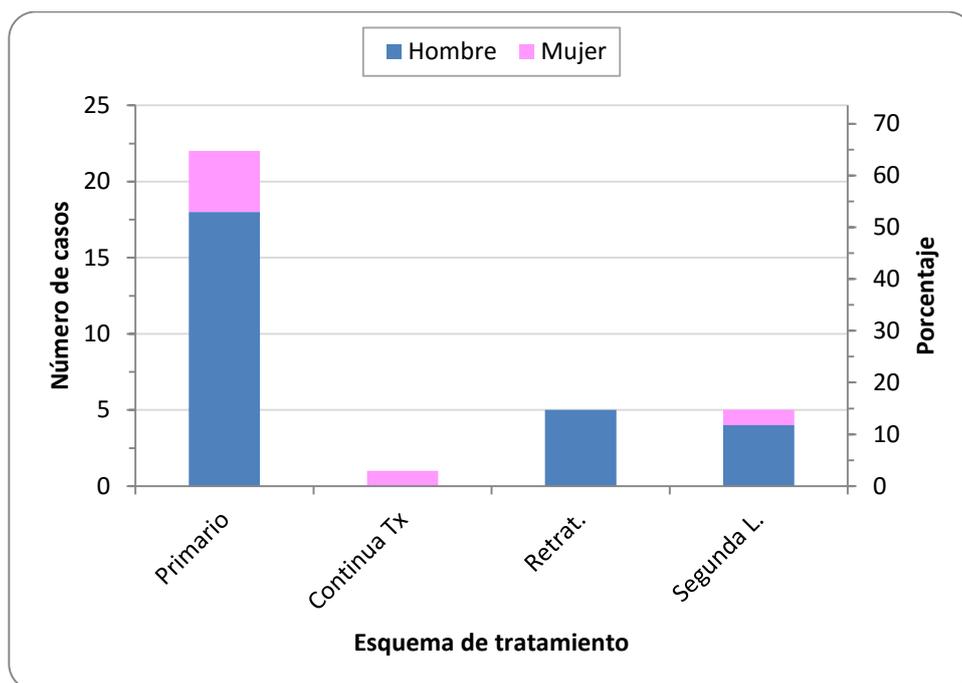


Figura 7. Número de casos de acuerdo al tratamiento administrado (n=33). Tx: tratamiento; Retrat: retratamiento; Segunda L.: tratamiento con fármacos de segunda línea).

4.3.1.3 Tiempo de tratamiento

El tiempo de tratamiento fue registrado en meses, siendo el más frecuente seis meses (21 casos, 63.6%), seguido de 12 meses (3 casos, 9.1%), siete meses (2 casos, 6.1%), y los demás periodos de tiempo (1 caso, 3% cada uno) (Figura 8). El caso de cero meses corresponde al aislado C206, que tuvo un egreso por defunción y los mayores a 12 meses fueron casos que recibieron tratamiento con fármacos de segunda línea, por ser farmacológicamente resistente a los cinco fármacos de primera línea (aislados C020, C023, C035, C194 y C205). No hubo mujeres en las categorías de menos de 6 meses ni mayor o igual a 24 meses (Tabla IV y Tabla V).

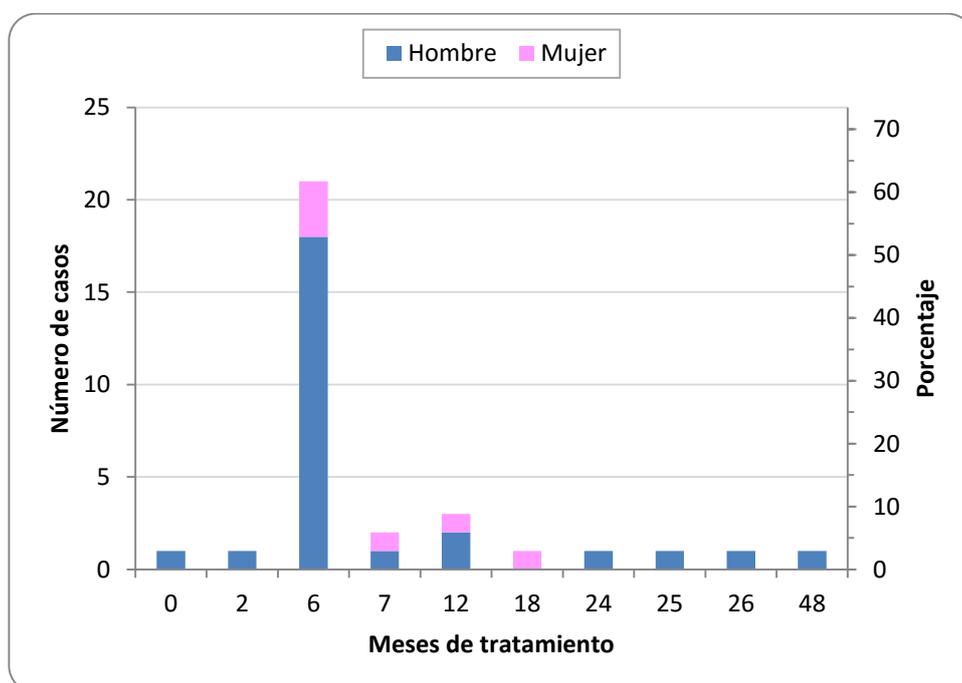


Figura 8. Número de casos de acuerdo al tiempo de tratamiento en meses (n=33).

4.3.1.4 Tipo de egreso

El tipo de egreso del paciente se clasificó en las siguientes categorías: 1) curado, 2) abandono, 3) término de tratamiento, 4) fracaso y 5) defunción.

La mayoría de los pacientes egresaron como curados (18 casos, 54.5%), seguido de abandono (7 casos, 21.2%), defunción (5 casos, 15.2%), fracaso (2 casos, 6.1%), y término de tratamiento (1 caso, 3%). No hubo mujeres en las categorías de “abandono” y “defunción”. Hubo un caso de fracaso tanto para hombres como para mujeres. El porcentaje de curados fue de 51.9% para los hombres y de 66.7% para las mujeres (Figura 9).

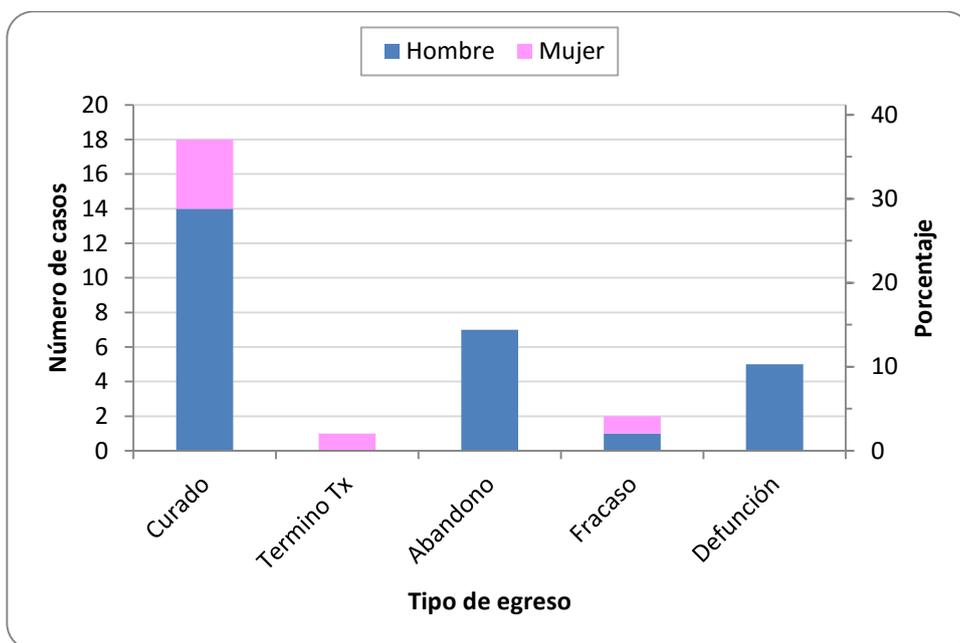


Figura 9. Número de casos según el tipo de egreso y sexo (n=33; Tx: Tratamiento).

Con el objeto de comparar el tipo de egreso con el tiempo de tratamiento, tipo de tratamiento e ingreso de los pacientes, se realizaron gráficas con la combinación de estas variables, que se describen a continuación.

4.3.1.4.1 Relación entre el tipo de egreso y tiempo de tratamiento

Todos los pacientes curados (n=18) llevaron tratamiento mínimamente por seis meses; el mayor porcentaje (10 casos, 55.6%) tomó tratamiento por seis meses, seguido por 12 meses (2 casos, 11.1%) y los demás (7, 18, 24, 25, 26, 27 y 48 meses) con tan solo un caso cada uno (3%). Los pacientes con egreso de “abandono” fueron siete, de los cuales cinco (71.4%) tomaron tratamiento por seis meses, uno por dos y otro por 12 meses (3% cada uno). Hubo dos casos de “fracaso”, ambos con seis meses de tratamiento. Hubo cinco defunciones, de las cuales cuatro (80%) habían tomado tratamiento por seis meses y sólo uno (20%) falleció poco después de haber sido diagnosticado. Hubo un solo caso que terminó el tratamiento, pero sin confirmación de su curación, el cual tomó tratamiento por siete meses (Figura 10).

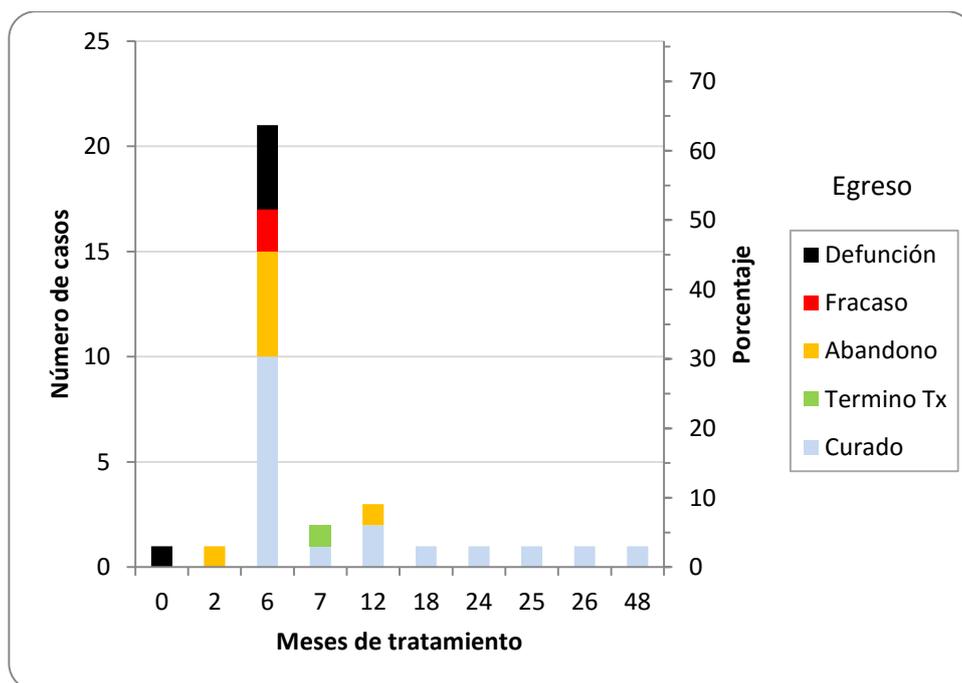


Figura 10. Número de casos de acuerdo al tiempo de tratamiento en meses y según el tipo de egreso del paciente (n=33, Tx: tratamiento).

4.3.1.4.2 Relación entre el tipo de egreso e ingreso

De los 18 pacientes que egresaron como curados (n=33, 54.5%), 14 ingresaron como casos nuevos (n=18, 77.8%), dos como reingresos y (n=18, 11.1%), de recaídas y fracasos hubo un caso de cada uno (n=18, 5.6%) y otro como fracaso (n=18, 5.6%). Hubo un solo caso de “término de tratamiento”, el cual fue caso nuevo. De los siete abandonos (n=33, 21.2%), cuatro fueron casos nuevos (n=7, 57.1%), uno fue un reingreso (n=7, 14.3%), y 2 casos ingresaron como recaídas (n=7, 28.6%). Los 2 casos con egreso de “fracaso” (n=33, 6.1%) habían ingresado como casos nuevos. De los cinco casos con egreso de “defunción” (n=33, 15.2%), cuatro habían sido recaídas (n=5, 80%) y uno era caso nuevo (n=5, 20%) (Figura 11).

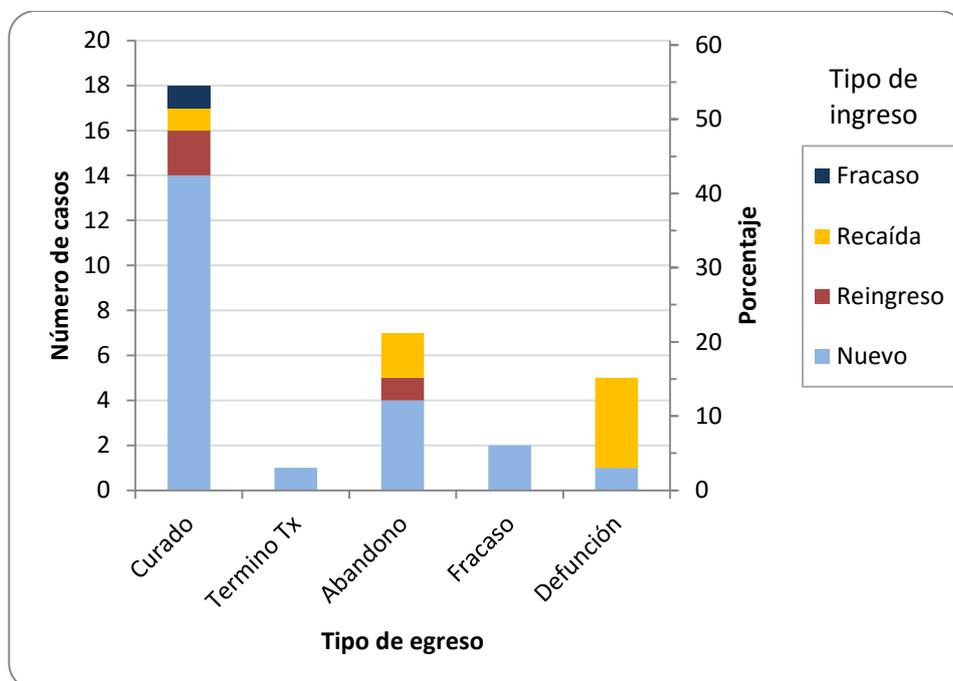


Figura 11. Número de casos según el tipo de egreso e ingreso (n=33; Tx: Tratamiento).

4.3.1.4.3 Relación entre el tipo de egreso y el tratamiento administrado

Respecto a la relación entre el tipo de egreso y el tratamiento administrado, de los 18 casos que egresaron como curados (n=33, 54.5%), 11 tomaron tratamiento primario (n=18, 61.1%), uno continuaba en tratamiento (n=18, 5.6%), uno llevó un retratamiento (n=18, 5.6%) y cinco llevaron tratamiento con fármacos de segunda línea (n=18, 27.8%). Hubo un solo caso con egreso “término de tratamiento” (n=33, 3%), el cual recibió tratamiento primario. De los siete casos con egreso como “abandono”, seis tuvieron tratamiento primario (n=7, 85.7%) y a uno le fue administrado un “retratamiento” (n=7, 14.3%). Los dos casos con egreso como “fracaso” (n=33, 6.1%) habían recibido tratamiento primario. De las cinco “defunciones” (n=33, 15.2%), dos recibieron tratamiento primario (n=5, 40%) y tres retratamiento (n=5, 60%) (Figura 12).

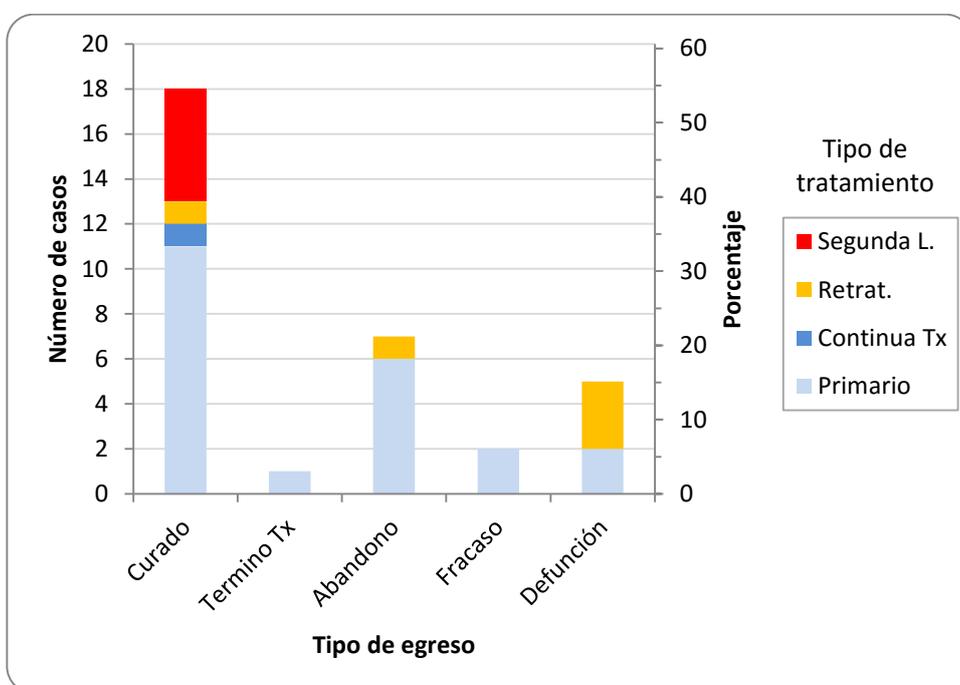


Figura 12. Número de casos según el tipo de egreso y el tipo de tratamiento administrado (n=33; Tx: Tratamiento; Segunda L.: tratamiento con fármacos de segunda línea; Retrat: Retratamiento).

4.3.2 Comorbilidades

En cuanto a comorbilidades, el mayor número de pacientes (16 casos, 48.5%) no presentó enfermedades asociadas. Entre los que sí presentaron alguna comorbilidad, la más frecuente fue diabetes (7 casos, 21.2%), seguida por alcoholismo y VIH/Sida (3 casos, 9.1% cada una); drogas, desnutrición, síndrome antifosfolipídico y otra (1 caso, 3% cada una). Sólo 2 de las 6 mujeres presentaron comorbilidades, siendo una desnutrición y la otra síndrome antifosfolipídico (Figura 13).

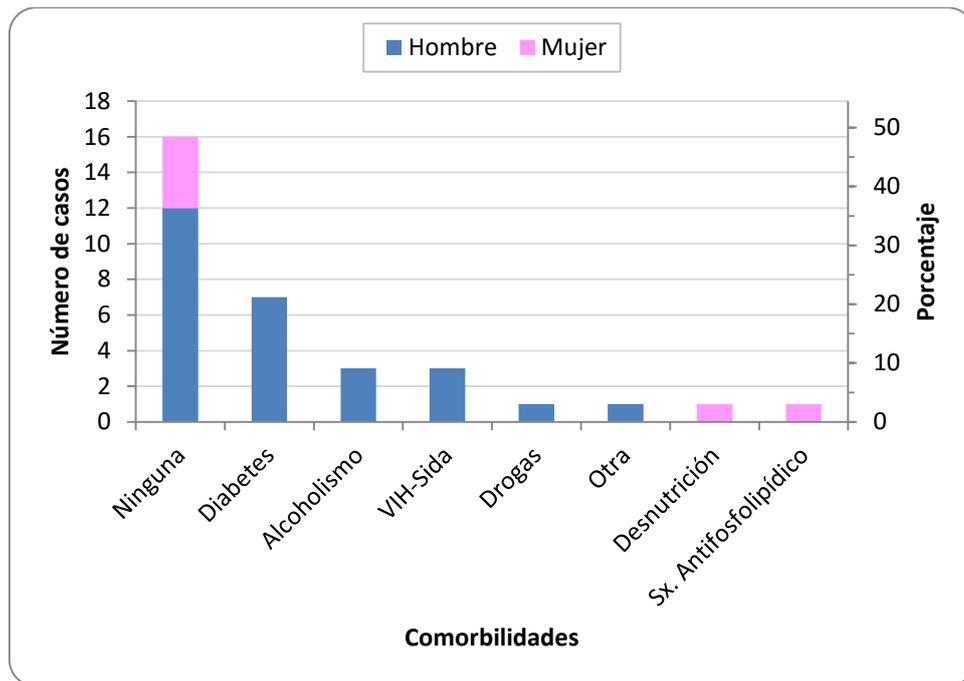


Figura 13. Número de casos por comorbilidad y por sexo (n=33; Sx: síndrome).

4.3.2.1 Relación entre las comorbilidades y el tipo de egreso

Con el objeto de determinar si las comorbilidades tuvieron alguna tendencia respecto al tipo de egreso, se relacionaron ambas variables en un gráfico (Figura 14). En la categoría de “curados” (n=18), el mayor porcentaje no tuvo enfermedades asociadas (11 casos, 61.1%), seguido de diabetes (3 casos, 16.7%), alcoholismo (2 casos, 11.1%), y VIH-Sida y desnutrición (1 caso, 5.6% cada una). El único caso de “término de tratamiento” no tuvo comorbilidades. En la categoría de “abandono” (n=7), tres casos (42.9%) no tuvieron enfermedades asociadas, dos (28.6%) presentaron VIH-Sida, y hubo un caso (14.3%) de drogas y de otra enfermedad no especificada (Figura 14).

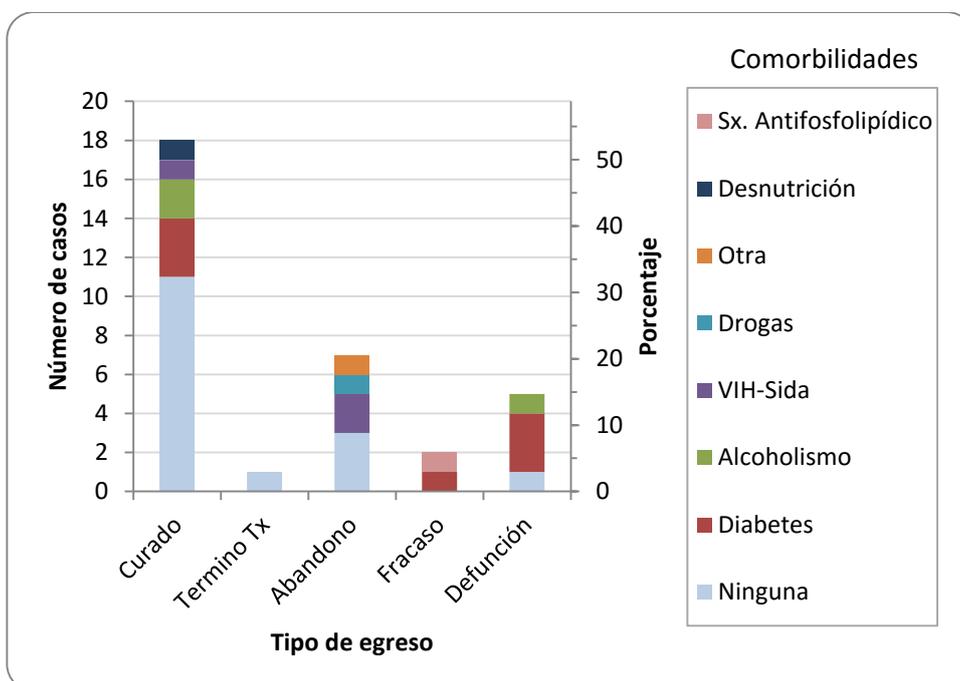


Figura 14. Número de casos de acuerdo al egreso y a las enfermedades asociadas a la TB (n=33; Tx: tratamiento; Sx: síndrome).

4.3.3 Características de drogorresistencia (fenotípica y molecular) y linajes

Se analizó la correlación entre las características moleculares (drogorresistencia y linajes) y la sensibilidad farmacológica (Tabla VI).

Tabla VI. Características de drogorresistencia farmacológica y molecular de los aislados, incluyendo linaje por MIRU-VNTR 12

AISLADO	FARMACOLÓGICO		MOLECULAR		
	SENSIBILIDAD	NIVEL DE DROGO-RRESISTENCIA	LINAJE	RESISTENCIA MOLECULAR	NIVEL DE DROGO-RRESISTENCIA
C020	HRZSE	TB-MDR	Haarlem	H, R, Z	TB-MDR
C022	HRS	TB-MDR	Beijing	H, R, S	TB-MDR
C023	HRSE	TB-MDR	Beijing	R, S	TB-PR
C031	HRZSE	TB-MDR	S	Z	TB-DR
C032	Z	TB-DR	LAM	sm	TB-PR
C034	HE	TB-PR	S	H, R, E	TB-MDR
C035	HR	TB-MDR	X	R, E	TB-PR
C036	HRE	TB-MDR	No def.	sm	sensible
C038	HRE	TB-MDR	S	sm	sensible
C046	RZ	TB-PR	Cameroon	sm	sensible
C057	HRZSE	TB-MDR	Ghana	sm	sensible
C062	HRZSE	TB-MDR	LAM	sm	sensible
C067	HRZSE	TB-MDR	S	sm	sensible
C075	HRZSE	TB-MDR	Beijing	sm	sensible
C078	HRZSE	TB-MDR	Uganda I	sm	sensible
C169	HRZSE	TB-MDR	Haarlem	sm	sensible
C171	HRSE	TB-MDR	Ghana	sm	sensible
C172	Z	TB-DR	Ghana	sm	sensible
C175	HRZSE	TB-MDR	LAM	sm	sensible
C176	HRZSE	TB-MDR	LAM	sm	sensible
C177	HRZSE	TB-MDR	EAI	H	TB-DR
C181	HRZSE	TB-MDR	LAM	sm	sensible
C183	HRZSE	TB-MDR	Haarlem	sm	sensible
C184	HRZSE	TB-MDR	Ghana	sm	sensible
C191	HRZSE	TB-MDR	LAM	sm	sensible
C193	HRZSE	TB-MDR	Ghana	sm	sensible
C194	HRZSE	TB-MDR	Uganda I	R, Z	TB-PR
C201	HRZSE	TB-MDR	Ghana	sm	sensible
C203	HRZSE	TB-MDR	Haarlem	sm	sensible
C204	HRZSE	TB-MDR	Beijing	H, R, S	TB-MDR
C205	HRZSE	TB-MDR	No def.	H, R, Z, E	TB-MDR
C206	HRZSE	TB-MDR	S	sm	sensible
C211	HRZSE	TB-MDR	S	H, R, E	TB-MDR

sm: sin mutación, H: isoniácida; R: rifampicina; Z: pirazinamida; S: estreptomycin; E: etambutol; No def.: no definido; linajes tomados de García-Ortiz (2013).

4.3.3.1 Sensibilidad farmacológica (fenotípica)

La mayoría de los casos (29 aislados, 87.9%) fueron TB-MDR, dos aislados (6.1%) TB-PR y dos aislados (6.1%) TB-DR. (Figura 15, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

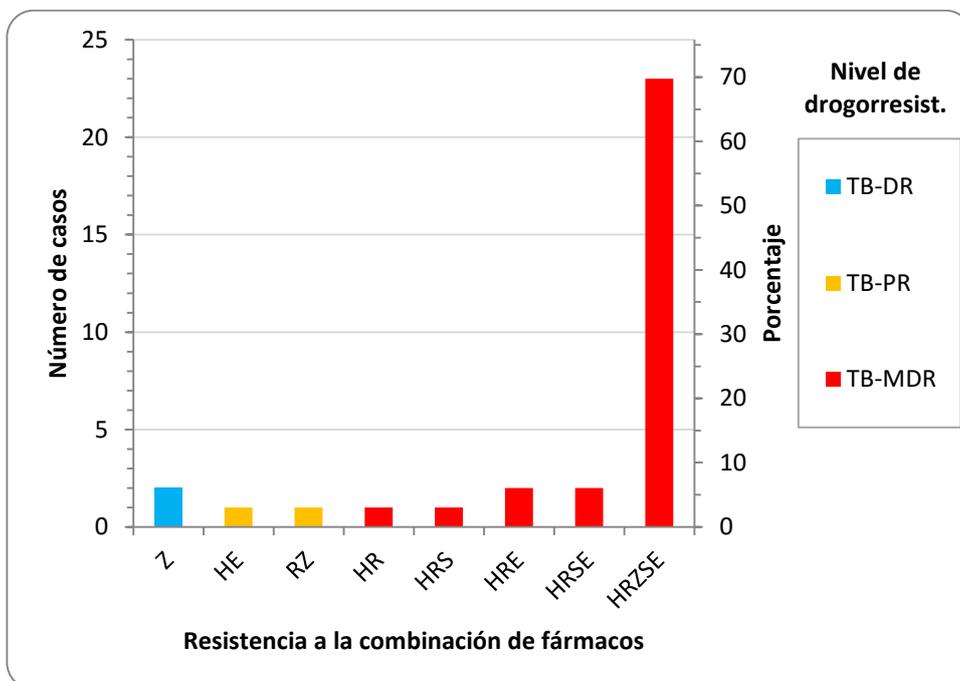


Figura 15. Número de casos de acuerdo a la combinación de drogorresistencia farmacológica y clasificación de la misma (n=33; H: isoniacida; R: rifampicina; Z: pirazinamida; S: estreptomina; E: etambutol; TB-DR: tuberculosis drogorresistente; TB-PR: tuberculosis polirresistente; TB-MDR: tuberculosis multi-drogorresistente; Nivel de drogorresistencia según clasificación de pág. 49).

4.3.3.2 Drogorresistencia molecular

De los 33 aislados drogorresistentes en las pruebas de sensibilidad farmacológica, se lograron amplificar los siete genes asociados a drogorresistencia para los cinco fármacos de primera línea en 26 de los aislados (78.8%). En cinco aislados (15.2%) se lograron amplificar seis de los siete genes. En los dos aislados restantes solo se lograron amplificar cinco y tres genes respectivamente (Anexo 4. Tablas de datos). Los genes que no se lograron amplificar se repitieron por lo menos tres veces, sin embargo, la secuencia obtenida fue de baja calidad para su lectura, por lo que se eliminaron del análisis.

El gen para el que se detectó un mayor porcentaje de aislados con mutaciones fue *rpoB* (9 aislados, 27.3%), seguido de *katG* (15.2%), *pncA* (13.8%), y *embB* (12.5%). Los demás genes (*rrS*, *inhA* y *rpsL*) presentaron porcentajes menores al 10% (Tabla VII).

Tabla VII. Número de aislados secuenciados para los siete genes asociados a drogorresistencia, indicando el número de aislados que presentaron mutaciones.

Antibiótico / Gen	Número de Aislados	Aislados secuenciados	% de Aislados secuenciados	Aislados con mutaciones	% de Aislados secuenciados con mutaciones
H / <i>katG</i>	33	33	100%	5	15.2%
H / <i>inhA</i>	33	33	100%	2	6.1%
R / <i>rpoB</i>	33	33	100%	9	27.3%
Z / <i>pncA</i>	33	29	88%	4	13.8%
S / <i>rpsL</i>	33	32	97%	1	3.1%
S / <i>rrS</i>	33	28	85%	2	7.1%
E / <i>embB</i>	33	32	97%	4	12.5%

De los 33 aislados que fueron drogorresistentes en las pruebas de sensibilidad farmacológica, solo 11 (33.3%) presentaron al menos una mutación en los genes asociados a drogorresistencia para alguno de los cinco fármacos de primera línea. (Anexo 4. Tablas de datos). Las secuencias de los aislados con mutaciones fueron sometidas al “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) y se encuentran disponibles en su página de internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Con el objeto de determinar si las mutaciones ya habían sido reportadas con anterioridad, se realizó una búsqueda en la base de datos de mutaciones de *M.*

tuberculosis descrita por Sandgren et al. (2009), disponible en internet (<https://tbdreamdb.ki.se/Info/>).

4.3.3.2.1 Mutaciones en el gen *rpoB*

El mayor número de aislados reportó mutaciones en el gen *rpoB* (8 aislados, 24.2%). Todas las mutaciones fueron no sinónimas, y en orden de frecuencia se presentaron en los codones 531 (4 aislados), 526 (3 aislados) y 516 (2 aislados), todas ya reportados previamente en la literatura (Donnabella et al., 1994; Kapur et al., 1994; Bodmer et al., 1995; Perdigão et al., 2010; Surcouf et al., 2011) (Tabla VIII).

Tabla VIII. Relación de aislados con mutaciones en el gen *rpoB*, asociado a resistencia contra rifampicina y sensibilidad para éste fármaco.

AISLADO	MUTACIÓN AMINOÁCIDO	MUTACIÓN NUCLEÓTIDO	REPORTADA	GB ID	SENSIBILIDAD FARMACOLÓGICA
C023	D516V	A1304T	si	KF 444080	resistente
C034	D516Y	G1303T	si	KF 444081	sensible
C035	H526Y	C1333T	si	KF 444082	resistente
C022	H526D	C1333G	si	KF444079	resistente
C204					resistente
C020	S531W	C1349G	si	KF444078	resistente
C194	S531L	C1349T	si	KF444083	resistente
C205					resistente
C211					resistente

Nota: GB ID: número de acceso a Gene Bank.

4.3.3.2.2 Mutaciones en el gen *inhA*

Solo dos aislados (6.1%) registraron mutaciones en el gen *inhA*. Las mutaciones detectadas se localizaron en el codón 94 y en la posición -39 del promotor. En el codón 94 se detectó la mutación S94A en el aislado C020, la cual ya había sido reportada (Lee et al., 2000). En la posición -39 del promotor se presentó la mutación C-39T en el aislado C177, no reportada previamente (Tabla IX).

Tabla IX. Relación de aislados con mutaciones en el gen *inhA*, asociado a resistencia contra isoniacida, y sensibilidad para éste fármaco.

AISLADO	MUTACIÓN AMINOÁCIDO	MUTACIÓN NUCLEÓTIDO	REPORTADA	GB ID	SENSIBILIDAD FARMACOLÓGICA
C020	S94A	T280G	si	KF444075	resistente
C177	promotor	C -39T	si	KF444077	resistente

Nota: GB ID: número de acceso a Gene Bank.

4.3.3.2.3 Mutaciones en el gen *katG*

Se identificaron mutaciones en el gen *katG* en cinco aislados (15.2%). La totalidad de estos aislados presentaron la misma mutación, S315T, la cual ya había sido reportada en la literatura por varios autores (Heym et al., 1995; Hass et al., 1997; Gandhi et al., 2013). (Tabla X).

Tabla X. Relación de aislados con mutaciones en el gen *katG*, asociado a resistencia contra isoniacida, y sensibilidad para éste fármaco.

AISLADO	MUTACIÓN AMINOÁCIDO	MUTACIÓN NUCLEÓTIDO	REPORTADA	GB ID	SENSIBILIDAD FARMACOLÓGICA
C022	S 315 T	G944C	si	KF477306	resistente
C034					
C204					
C205					
C211					

Nota: GB ID: número de acceso a Gene Bank.

4.3.3.2.4 Mutaciones en el gen *pncA*

Se identificaron mutaciones en el gen *pncA* en cuatro aislados (12.1%). En este gen se presentaron cuatro mutaciones no sinónimas diferentes y una en el promotor. Las mutaciones no sinónimas fueron en los codones 57 (aislado C031, 3%), 102 (aislado C194, 3%), simultáneamente en codones 105 y 150 (aislado C020, 3%) y en la posición -11 del promotor (aislado C205, 3%). De éstas, las de los codones 105 y 150 (aislado C020) no habían sido reportadas con anterioridad. La mutación en el aislado C031 tampoco estaba reportada (Tabla XI).

Tabla XI. Relación de aislados con mutaciones en el gen *pncA*, asociado a resistencia contra pirazinamida, y sensibilidad para éste fármaco.

AISLADO	MUTACIÓN AMINOÁCIDO	MUTACIÓN NUCLEÓTIDO	REPORTADA	GB ID	SENSIBILIDAD FARMACOLÓGICA
C031	H57R	A170G	no	KF429479	resistente
C194	A102 T	G304A	si	KF429483	sensible
C020	G105V	G314T	no	KF429478	resistente
	G150D	G449A	no		
C205	promotor	A-11G	si	KF429484	sensible

Nota: GB ID: número de acceso a Gene Bank.

4.3.3.2.5 Mutaciones en el gen *rpsL*

Se identificaron mutaciones en el gen *rpsL* en un aislados (3% de la población de estudio y 9.1% de los aislados con mutaciones). El aislados C023 presentó la mutación no sinónima K43R, la cual ya había sido reportada (Nair et al., 1993) (Tabla XII).

Tabla XII. Relación de aislados con mutaciones en el gen *rpsL*, asociado a resistencia contra estreptomycin, y sensibilidad farmacológica para éste fármaco.

AISLADO	MUTACIÓN AMINOÁCIDO	MUTACIÓN NUCLEÓTIDO	REPORTADA	GB ID	SENSIBILIDAD FARMACOLÓGICA
C023	K43R	A128G	si	KF477305	resistente

Nota: GB ID: número de acceso a Gene Bank.

4.3.3.2.6 Mutaciones en el gen *rrs*

Se identificaron mutaciones en el gen *rrs* (de la subunidad 16S del ARN ribosómico (ARNr)) en dos aislados (6.1% de la población de estudio y 18.2% de los aislados con mutaciones). Al ser *rrs* un gen para ARNr, las mutaciones se expresan en términos de nucleótidos. Los aislados C022 y C204 presentaron la mutación A513C, reportada con anterioridad (Finken et al., 1993; Meier et al., 1994; Sreevatsan et al., 1996) (Tabla XIII).

Tabla XIII. Relación de aislados con mutaciones en el gen *rrS*, asociado a resistencia contra estreptomycin, y sensibilidad para éste fármaco.

AISLADO	MUTACIÓN AMINOÁCIDO	MUTACIÓN NUCLEÓTIDO	REPORTADA	GB ID	SENSIBILIDAD FARMACOLÓGICA
C022	ribosomal	A513C	si	pendiente	resistente
C204				pendiente	resistente

Nota: GB ID: número de acceso a Gene Bank.

4.3.3.2.7 Mutaciones en el gen *embB*

Se identificaron mutaciones no sinónimas en el gen *embB* en cuatro aislados (12.1% de la población de estudio, 36.4% de los aislados con mutaciones), localizadas en el codón 306. Los aislados C034, C035 y C211 (75%) presentaron la mutación M306I, previamente reportada (Sreevatsan et al., 1997b; Shi et al., 2011); el aislado C205 (25%) presentó la mutación M306V, reportada previamente (Sreevatsan et al., 1997b; Shi et al., 2011; Gandhi et al., 2013) (Tabla XIV).

Tabla XIV. Relación de aislados con mutaciones en el gen *embB*, asociado a resistencia contra etambutol, y sensibilidad para éste fármaco.

AISLADO	MUTACIÓN AMINOÁCIDO	MUTACIÓN NUCLEÓTIDO	REPORTADA	GB ID	SENSIBILIDAD FARMACOLÓGICA
C034	M306I	G918A	si	KF417423	resistente
C035					sensible
C211					resistente
C205	M306V	A916G	si	KF417424	sensible

Nota: GB ID: número de acceso a Gene Bank.

4.3.3.3 Linajes

La determinación de los linajes fue realizada utilizando 12 loci de MIRU-VNTR por (García-Ortiz, 2013). De los 33 aislados de la muestra de estudio, el mayor porcentaje corresponde a los linajes S, LAM y Ghana (6 casos, 18.2% cada uno); seguido de los linajes Haarlem y Beijing (4 casos, 12.1% cada uno); Uganda I y No definido (2 casos, 6.1% cada uno); X, Cameroon y EAI (1 caso, 3% cada uno). Ninguno de los aislados de linaje LAM, Ghana y Cameroon presentaron mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia. Los linajes con mayor número de aislados con mutaciones en genes asociados a drogorresistencia fueron el Beijing (n=4, 75% con mutaciones) y S (n=6, 50% con mutaciones). Solo se presentó un caso de los linajes X y EAI, y ambos presentaron alguna mutación en los genes asociados a drogorresistencia (Figura 16).

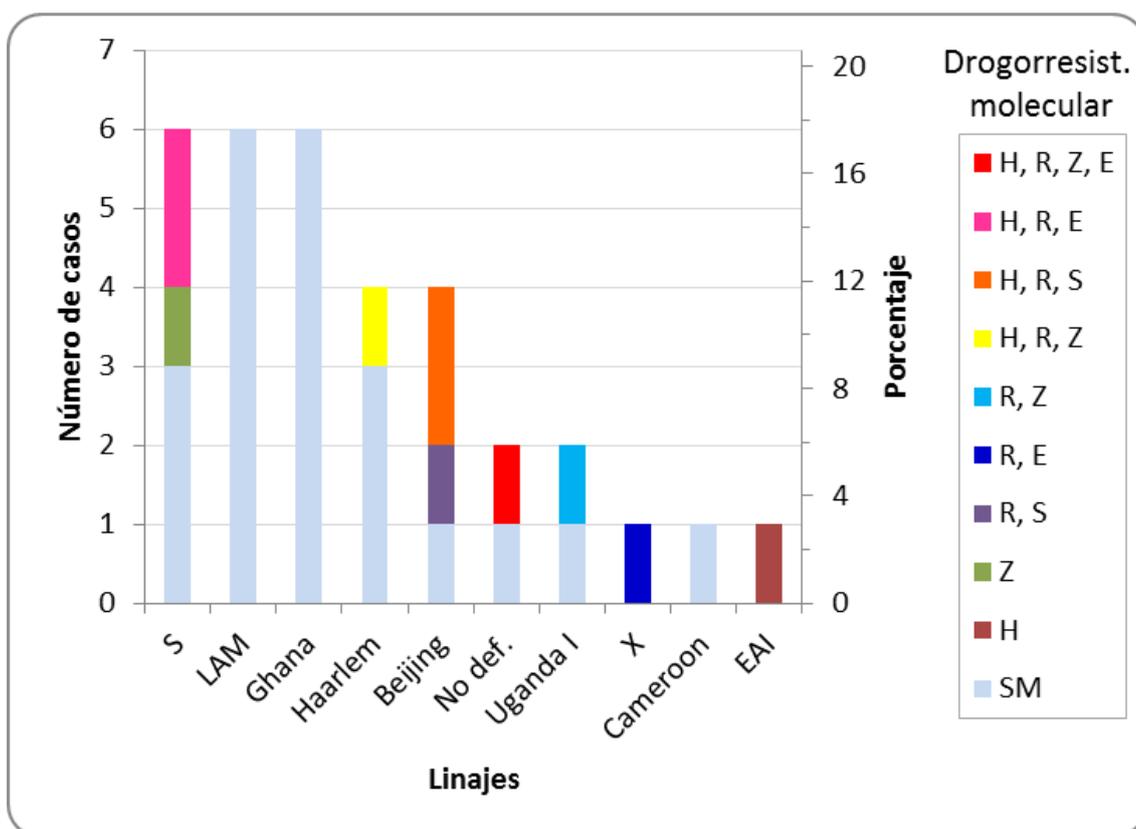


Figura 16. Número de casos de acuerdo al linaje determinado por MIRU-VNTR 12 y de acuerdo a la combinación de mutaciones en genes asociados a drogorresistencia (n=33; Fármacos de acuerdo a abreviaturas de Tabla I; SM: sin mutación; No def: linaje no definido; linajes tomados de García-Ortiz (2013)

Al comparar los linajes con la sensibilidad farmacológica, todos los aislados correspondientes a los linajes Haarlem, Uganda I y EAI presentaron drogorresistencia para los cinco fármacos de primera línea. Los demás linajes presentaron diferentes combinaciones de drogorresistencia a los cinco fármacos de primera línea y en diferentes proporciones (Figura 17).

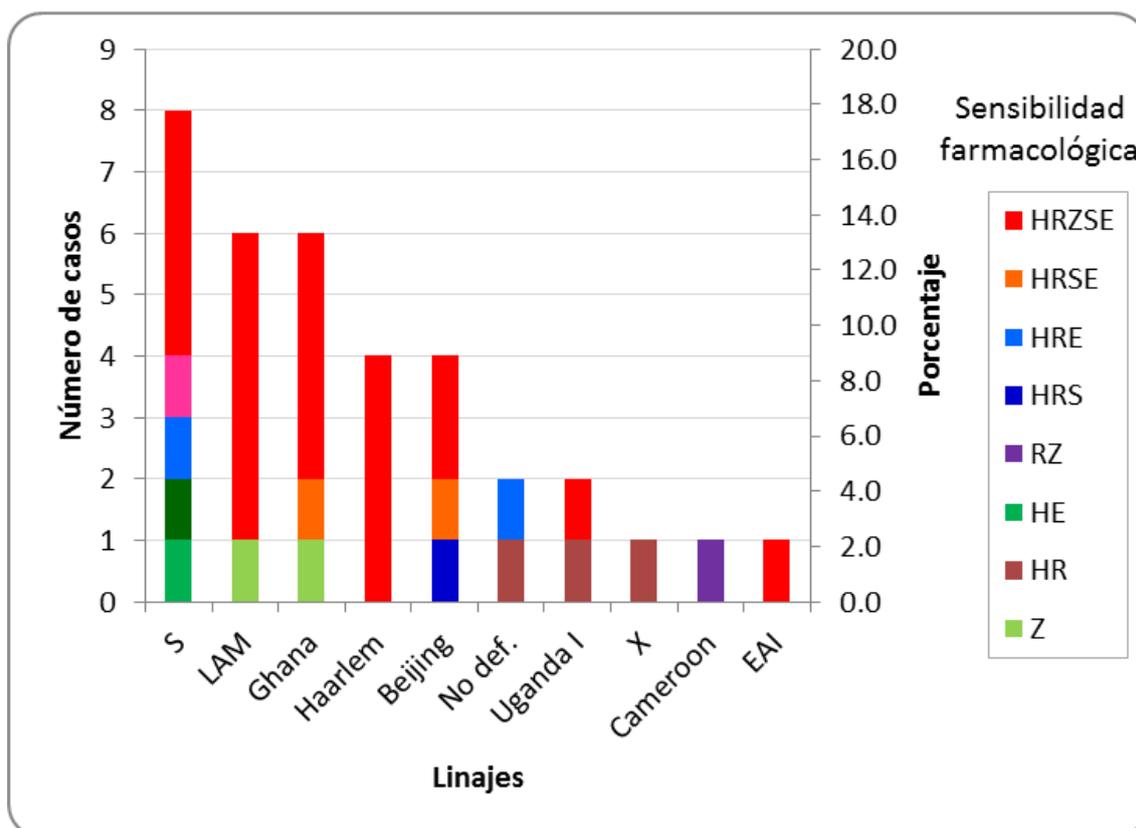


Figura 17. Número de casos de acuerdo al linaje determinado por MIRU-VNTR 12 y a la sensibilidad farmacológica (n=33; Fármacos de acuerdo a abreviaturas de Tabla I; No def: Linaje no definido; linajes tomados de (García-Ortiz, 2013)

4.3.3.4 Resumen de mutaciones, linajes por MIRU-VNTR 12, drogorresistencia farmacológica y egreso de los pacientes.

Tabla XV. Mutaciones que presentó cada aislado en genes asociados con drogorresistencia para fármacos de primera línea, en términos de codones, ordenados por tipo de egreso y linaje (MIRU-VNTR 12).

Fármaco →	H		R	Z	S		E	Linaje	Drogorresistencia farmacológica	Egreso
Gen →	<i>inhA</i>	<i>katG</i>	<i>rpoB</i>	<i>pncA</i>	<i>rspL</i>	<i>rrs</i>	<i>embB</i>			
Aislado ↓										
C022		S315T	H526D			A513C		Beijing	HRS	Abandono
C204		S315T	H526D			A513C		Beijing	HRZSE	Abandono
C177	C-39T							EAI	HRZSE	Abandono
C169								Haarlem	HRZSE	Abandono
C183								Haarlem	HRZSE	Abandono
C036								No def.	HRE	Abandono
C078								Uganda I	HRZSE	Abandono
C023			D516V		K43R			Beijing	HRSE	Curado
C075								Beijing	HRZSE	Curado
C046								Cameroon	RZ	Curado
C171								Ghana	HRSE	Curado
C172								Ghana	Z	Curado
C184								Ghana	HRZSE	Curado
C193								Ghana	HRZSE	Curado
C201								Ghana	HRZSE	Curado
C020	S94A		S531W	G105V, G150D				Haarlem	HRZSE	Curado
C203								Haarlem	HRZSE	Curado
C175								LAM	HRZSE	Curado
C176								LAM	HRZSE	Curado
C181								LAM	HRZSE	Curado
C191								LAM	HRZSE	Curado
C205		S315T	S531L	A-11G			M306V	No def.	HR	Curado
C067								S	HRZSE	Curado
C194			S531L	A102T				Uganda I	HR	Curado
C035			H526Y				M306I	X	HR	Curado
C057								Ghana	HRZSE	Defunción
C032								LAM	Z	Defunción
C031				H57R				S	HRZSE	Defunción
C034		S315T	D516Y				M306I	S	HE	Defunción
C206								S	HRZSE	Defunción
C038								S	HRE	Fracaso
C211		S315T	S531L				M306I	S	HRZSE	Fracaso
C062								LAM	HRZSE	Termino Tx

Nota: En negritas las mutaciones expresadas en términos de nucleótidos, por ser en la región promotora o ADN ribosómico. Linajes tomados de García-Ortiz (2013).

4.3.4 Comparación entre sensibilidad farmacológica, drogorresistencia molecular, tipo de egreso y tratamiento administrado.

Se registró poca asociación entre los resultados de sensibilidad farmacológica de las cepas y las mutaciones presentes en los genes asociados a drogorresistencia (drogorresistencia molecular). La mayoría (22 de 33, 66.7%) de las cepas con drogorresistencia farmacológica no presentaron mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para los cinco fármacos de primera línea (Figura 18).

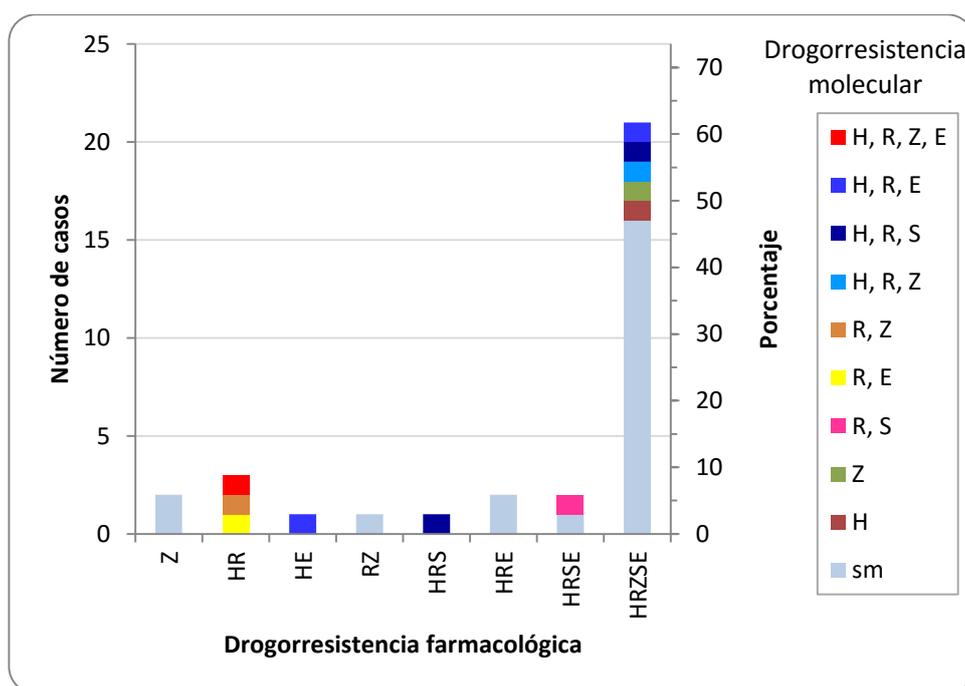


Figura 18. Número de aislados de acuerdo a su drogorresistencia farmacológica y molecular (n=33; sm: sin mutaciones).

El tipo de egreso tampoco se relacionó con la drogorresistencia farmacológica. Trece de los 18 casos (72.2%) de pacientes “curados” correspondieron a cepas TB-MDR de acuerdo a la prueba MGIT 960 (Figura 19). siendo que solo cinco de ellos recibieron tratamiento con fármacos de segunda línea (Figura 20)

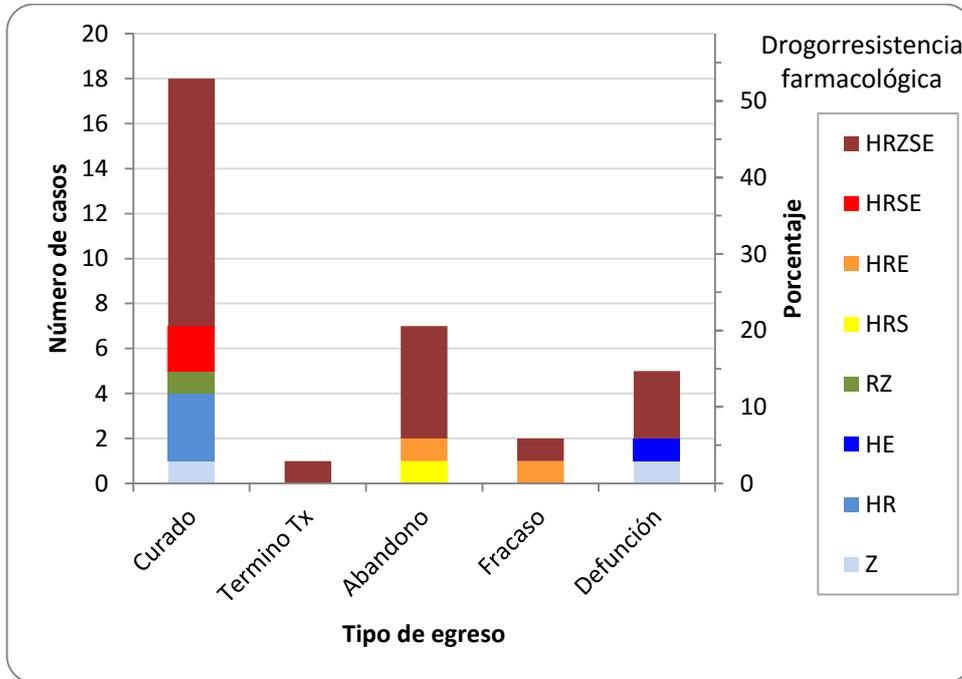


Figura 19. Número de casos de acuerdo al egreso y a la drogorresistencia farmacológica (n=33; Abreviaturas de fármacos de acuerdo a Tabla I).

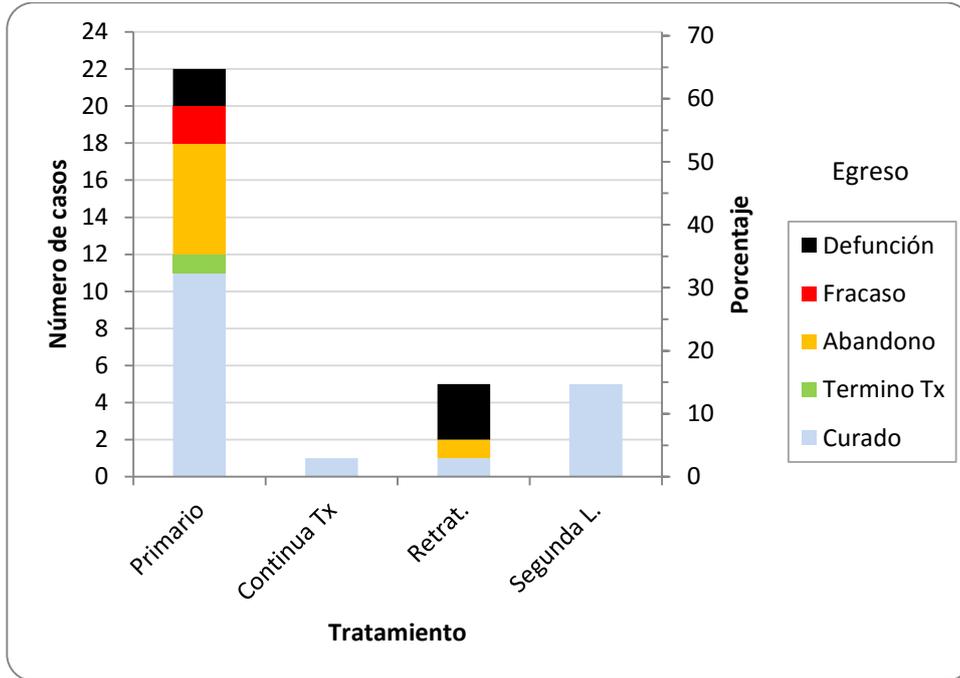


Figura 20. Número de casos según el tratamiento administrado y el tipo de egreso del paciente (Tx: tratamiento; Retrat.: retratamiento; Segunda L.: tratamiento con fármacos de segunda línea).

Se comparó la drogorresistencia molecular con el egreso y tipo de tratamiento de los pacientes. De los pacientes curados (n=18), 13 no presentaron mutaciones y los cinco restantes son los que recibieron tratamiento con fármacos de segunda línea (Figura 20 y Figura 21), debido a que se detectó oportunamente drogorresistencia mediante el método MGIT 960. Las demás categorías de egreso (que pueden considerarse como el grupo de no curados), recibieron tratamiento primario aun cuando presentaron diferentes grados de drogorresistencia (Figura 20 y Figura 21).

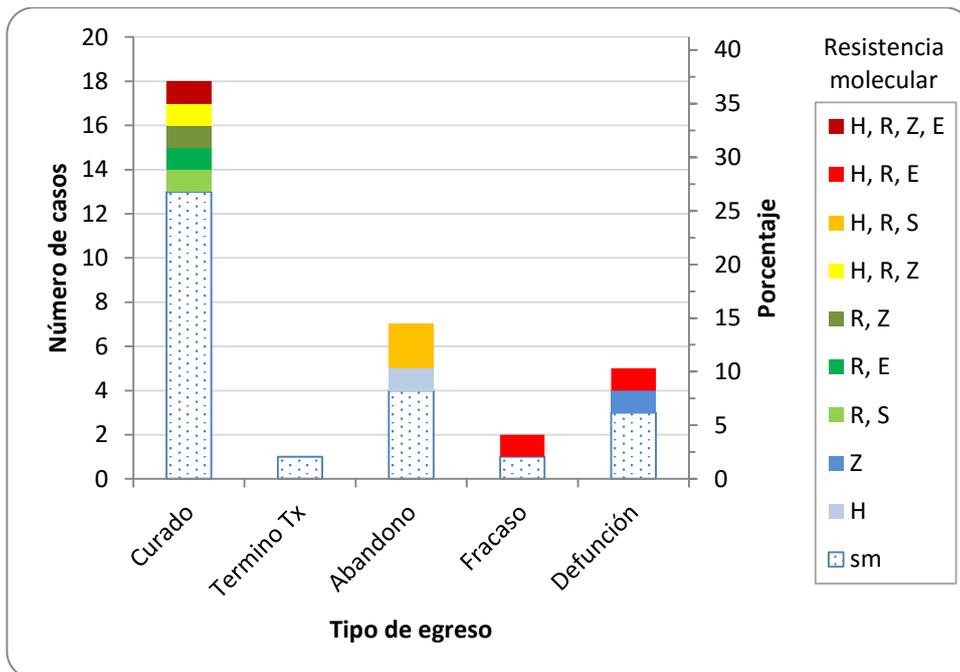


Figura 21. Número de casos de acuerdo al egreso y a la drogorresistencia molecular (n=33; Abreviaturas de fármacos de acuerdo a Tabla I; Tx: tratamiento; sm: sin mutaciones).

4.4 Análisis epidemiológico molecular

Para su análisis, los aislados se clasificaron en cuatro categorías de acuerdo a la presencia o ausencia de mutaciones en los siete genes asociados a drogorresistencia:

- Sin mutaciones
- Con alguna mutación (TB-DR+TB-PR+TB-MDR)
- Grupo TB-DR + TB-PR
- Grupo TB-MDR

Se determinaron las RMs e IC 95% para todos los grupos con algún grado de drogorresistencia contra el grupo sin mutaciones, y entre los grupos TB-DR+TB-PR y TB-MDR.

4.4.1 Asociación de variables sociodemográficas y clínicas con la sensibilidad farmacológica

Todos los aislados tuvieron algún grado de drogorresistencia farmacológica, por lo que al menos fueron TB-DR. Al agrupar los aislados TB-DR con los TB-PR y comparar este grupo con los aislados TB-MDR, se evidenciaron algunas tendencias en sus razones de momios (RM), aunque no fueron estadísticamente significativas (los IC 95% incluyen la unidad y $P > 0.05$) debido al bajo número de casos que cumplieron los criterios de inclusión (Tabla XVI).

Tabla XVI. Número de casos clasificados según las variables sociodemográficas y clínicas de acuerdo al nivel de drogorresistencia farmacológico y razón de momios con sus parámetros estadísticos.

Variable	Total		TB-DR+TB-PR		TB-MDR		RM	IC 95%		Z	P
	n=33	%	4	%	29	%		Mín	Máx		
Sexo: Hombre	27	79	4	100	23	79	0.4	0.0	8.5	0.59	0.56
Sexo: Mujer	6	18	0	0	6	21	2.5	0.1	52.5	0.59	0.56
LN foráneo	18	53	2	50	16	55	1.2	0.2	10.0	0.20	0.85
Diabetes	7	21	2	50	5	17	0.2	0.0	1.9	1.41	0.16
VIH-SIDA	3	9	0	0	3	10	1.2	0.1	27.1	0.11	0.91
Desnutrición	1	3	0	0	1	3	0.5	0.0	13.5	0.44	0.66
Drogas	1	3	0	0	1	3	0.5	0.0	13.5	0.44	0.66
Alcoholismo	3	9	1	25	2	7	0.2	0.0	3.2	1.10	0.27
Ninguna	16	47	1	25	15	52	3.2	0.3	34.6	0.96	0.34
Sx. Antifosfolipídico	1	3	0	0	1	3	0.5	0.0	13.5	0.44	0.66
Otra	1	3	0	0	1	3	0.5	0.0	13.5	0.44	0.66
Nuevo	22	65	2	50	20	69	2.2	0.3	18.4	0.74	0.46
Reingreso	3	9	0	0	3	10	1.2	0.1	27.1	0.11	0.91
Recaída	7	21	2	50	5	17	0.2	0.0	1.9	1.41	0.16
Fracaso	1	3	0	0	1	3	0.5	0.0	13.5	0.44	0.66
Curado	18	53	2	50	16	55	1.2	0.2	10.0	0.20	0.85
Termino Tx	1	3	0	0	1	3	0.5	0.0	13.5	0.44	0.66
Abandono	7	21	0	0	7	24	3.0	0.1	62.5	0.71	0.48
Fracaso	2	6	0	0	2	7	0.8	0.0	20.0	0.12	0.90
Defunción	5	15	2	50	3	10	0.1	0.0	1.2	1.84	0.07
Primario	22	65	2	50	20	69	2.2	0.3	18.4	0.74	0.46
Continua Tx	1	3	0	0	1	3	0.5	0.0	13.5	0.44	0.66
Retrat.	5	15	2	50	3	10	0.1	0.0	1.2	1.84	0.07
Segunda L.	5	15	0	0	5	17	2.0	0.1	43.3	0.45	0.65
< 6 meses	2	6	0	0	2	7	0.8	0.0	20.0	0.12	0.90
6 mes	21	62	3	75	18	62	0.5	0.1	5.9	0.50	0.62
> 6 meses	10	29	1	25	9	31	1.4	0.1	14.8	0.25	0.81

Nota: RM: razón de momios; IC 95%: intervalo al 95% de confianza; Z: estadístico Z; P: nivel de significancia estadística. No hubo valores estadísticamente significativos.

4.4.2 Asociación de variables sociodemográficas y clínicas con la drogorresistencia molecular

Sólo 11 aislados de los 33 con drogorresistencia farmacológica presentaron alguna mutación en al menos uno de los genes asociados con drogorresistencia para los fármacos de primera línea. Al evaluar la asociación entre la presencia o ausencia de mutaciones con las variables sociodemográficas y clínicas, sólo en cuatro de ellas se encontraron RMs estadísticamente significativas, en el tipo de tratamiento y el tiempo en que fue administrado (Tabla XVII):

- Tratamiento primario (RM=0.13, IC 95% entre 0.02 y 0.65, P=0.01), mostrando que los pacientes que recibieron tratamiento primario tienen una proporción de 0.13 veces el de otros tipos de tratamiento, de estar infectados con una cepa que presente mutaciones en genes asociados a drogorresistencia para fármacos de primera línea.
- Tratamiento con fármacos de segunda línea (RM=38.08, IC 95% entre 1.85 y 783.2, P=0.02), mostrando que los pacientes que recibieron tratamiento con fármacos de segunda línea tienen una proporción de 38.08 veces el de otros tipos de tratamiento, de estar infectados con una cepa que presente mutaciones en genes asociados a drogorresistencia para fármacos de primera línea.
- Tratamiento administrado por 6 meses (RM= 0.17, IC 95% entre 0.03 y 0.82, P=0.03), mostrando que los pacientes que recibieron tratamiento primario por 6 meses tienen una proporción de 0.17 veces el de otros periodos de tiempo de tratamiento, de estar infectados con una cepa que presente mutaciones en genes asociados a drogorresistencia para fármacos de primera línea.
- Tratamiento administrado por más de 6 meses (RM=5.4, IC 95% entre 1.08 y 26.93, P=0.04), mostrando que los pacientes que recibieron tratamiento por más de seis meses tienen una proporción de 5.4 veces el de periodos de tiempo menores, de estar infectados con una cepa que presente mutaciones en genes asociados a drogorresistencia para fármacos de primera línea.

Tabla XVII. Número de casos clasificados según las variables sociodemográficas y clínicas de acuerdo a la presencia o ausencia de mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para los fármacos de primera línea.

Variable	Total		sin mutación		con alguna mutación		RM	IC 95%		Z	P
	33	%	22	%	11	%		Mín	Máy		
Sexo: Hombre	27	79	18	82	9	82	1.00	0.15	6.53	0.00	1.00
Sexo: Mujer	6	18	4	18	2	18	1.00	0.15	6.53	0.00	1.00
LN foráneo	19	56	12	55	7	64	1.46	0.33	6.46	0.50	0.62
Diabetes	7	21	4	18	3	27	1.69	0.30	9.36	0.60	0.55
VIH-SIDA	3	9	2	9	1	9	1.00	0.08	12.40	0.00	1.00
Desnutrición	1	3	1	5	0	0	0.62	0.02	16.56	0.28	0.78
Drogas	1	3	1	5	0	0	0.62	0.02	16.56	0.28	0.78
Alcoholismo	3	9	2	9	1	9	1.00	0.08	12.40	0.00	1.00
Ninguna	16	47	11	50	5	45	0.83	0.20	3.56	0.25	0.81
Sx. Antifosfolipídico	1	3	0	0	1	9	6.43	0.24	171.4	1.11	0.27
Otra	1	3	1	5	0	0	0.62	0.02	16.56	0.28	0.78
Nuevo	22	65	17	77	5	45	0.25	0.05	1.15	1.78	0.08
Reingreso	3	9	2	9	1	9	1.00	0.08	12.40	0.00	1.00
Recaída	7	21	3	14	4	36	3.62	0.64	20.41	1.46	0.15
Fracaso	1	3	0	0	1	9	6.43	0.24	171.4	1.11	0.27
Curado	18	53	13	59	5	45	0.60	0.13	2.48	0.74	0.46
Termino Tx	1	3	1	5	0	0	0.00	0.02	16.56	0.28	0.78
Abandono	7	21	4	18	3	27	1.69	0.30	9.36	0.60	0.55
Fracaso	2	6	1	5	1	9	2.10	0.12	37.1	0.51	0.61
Defunción	5	15	3	14	2	18	1.41	0.20	9.96	0.34	0.73
Primario	22	65	18	82	4	36	0.13	0.02	0.65	2.46	0.01
Continua Tx	1	3	1	5	0	0	0.62	0.02	16.56	0.28	0.78
Retrat.	5	15	3	14	2	18	1.41	0.20	9.96	0.34	0.73
Segunda L.	5	15	0	0	5	45	38.08	1.85	783.2	2.36	0.02
< 6 meses	2	6	1	5	1	9	2.10	0.12	37.12	0.51	0.61
6 mes	21	62	17	77	4	36	0.17	0.03	0.82	2.21	0.03
> 6 meses	10	29	4	18	6	55	5.40	1.08	26.93	2.06	0.04

Nota: RM: razón de momios; IC 95%: intervalo al 95% de confianza; Z: estadístico Z; P: nivel de significancia estadística. Valores estadísticamente significativos resaltados en negritas.

Se evaluó la asociación entre el grupo de aislados TB-DR y TB-PR y los que no presentaron mutaciones para cada una de las variables sociodemográficas y clínicas, arrojando RMs sin significancia estadística en su mayoría, con excepción del tipo de tratamiento primario (RM=0.06, IC 95% entre 0 y 0.64, P=0.02), mostrando que los pacientes a los que se les administró tratamiento primario presentaron una proporción de 0.06 veces la de otros tipos de tratamiento, de estar infectados con una cepa clasificada molecularmente como TB-DR o TB-PR. Como contraparte de esto, los que recibieron tratamiento con fármacos de segunda línea también tuvieron RMs con significancia estadística (RM=63, IC 95% entre 2.47 y 1606, P=0.01), mostrando que los pacientes a los que se les administró tratamiento con fármacos de segunda línea presentaron una proporción de 63 veces la de otros tipos de tratamiento, de estar infectados con una cepa clasificada molecularmente como TB-DR o TB-PR (Tabla XVIII)

Se evaluó la asociación entre el grupo de aislados TB-MDR y los que no presentaron mutaciones para cada una de las variables sociodemográficas y clínicas, arrojando RMs sin significancia estadística para la mayoría de las variables, excepto para el tratamiento con fármacos de segunda línea (RM=25, IC 95% entre 1.02 y 613.72, P=0.05), mostrando que los pacientes a los que se les administró tratamiento con fármacos de segunda línea presentaron una proporción de 25 veces la de otros tipos de tratamiento, de estar infectados con una cepa clasificada molecularmente como TB-MDR (Tabla XIX).

Tabla XVIII. Número de casos clasificados según las variables sociodemográficas y clínicas de los grupos de aislados sin mutaciones y clasificado molecularmente como TB-DR + TB-PR.

Variable	Total		sin mutación		TB-DR + TB-PR		RM	IC 95%		Z	P
	33	%	22	%	5	%		Mín	Máx		
Sexo: Hombre	27	79	18	82	4	80	0.89	0.08	10.24	0.09	0.92
Sexo: Mujer	6	18	4	18	1	20	1.13	0.10	12.97	0.09	0.92
LN foráneo	19	56	12	55	2	40	0.56	0.08	4.01	0.58	0.56
Diabetes	7	21	4	18	2	40	3.00	0.37	24.30	1.30	0.30
VIH-SIDA	3	9	2	9	0	0	0.75	0.03	17.91	0.18	0.86
Desnutrición	1	3	1	5	0	0	1.30	0.05	36.58	0.16	0.88
Drogas	1	3	1	5	0	0	1.30	0.05	36.58	0.16	0.88
Alcoholismo	3	9	2	9	1	20	2.50	0.18	34.67	0.68	0.49
Ninguna	16	47	11	50	2	40	0.67	0.09	4.80	0.40	0.69
Sx. Antifosfolípídico	1	3	0	0	0	0					
Otra	1	3	1	5	0	0	1.30	0.05	36.58	0.16	0.88
Nuevo	22	65	17	77	3	60	0.44	0.06	3.42	0.78	0.43
Reingreso	3	9	2	9	0	0	0.75	0.03	17.90	0.18	0.85
Recaída	7	21	3	14	2	40	4.22	0.48	36.77	1.30	0.19
Fracaso	1	3	0	0	0	0					
Curado	18	53	13	59	3	60	1.04	0.14	7.53	0.04	0.97
Termino Tx	1	3	1	5	0	0	1.30	0.05	36.58	0.16	0.88
Abandono	7	21	4	18	1	20	1.13	0.10	12.97	0.09	0.92
Fracaso	2	6	1	5	0	0	1.30	0.05	36.58	0.16	0.88
Defunción	5	15	3	14	1	20	1.58	0.13	19.42	0.36	0.72
Primario	22	65	18	82	1	20	0.06	0.00	0.64	2.32	0.02
Continua Tx	1	3	1	5	0	0	1.30	0.05	36.58	0.16	0.88
Retrat.	5	15	3	14	1	20	1.58	0.13	19.42	0.36	0.72
Segunda L.	5	15	0	0	3	60	63.00	2.47	1606	2.51	0.01
< 6 meses	2	6	1	5	0	0	1.30	0.05	36.58	0.16	0.88
6 mes	21	62	17	77	2	40	0.20	0.03	1.52	1.56	0.12
> 6 meses	10	29	4	18	3	60	6.75	0.83	54.67	1.79	0.07

Nota: RM: razón de momios; IC 95%: intervalo al 95% de confianza; Z: estadístico Z; P: nivel de significancia estadística. Valores estadísticamente significativos resaltados en negritas.

Tabla XIX. Número de casos clasificados según las variables sociodemográficas y clínicas de los grupos de aislados sin mutaciones y clasificado molecularmente como TB-MDR.

Variable	Total		sin mutación		TB-MDR		RM	IC 95%		Z	P
	33	%	22	%	6	%		Mín	Máx		
Sexo: Hombre	27	79	18	82	5	83	1.11	0.10	12.31	0.09	0.93
Sexo: Mujer	6	18	4	18	1	17	0.90	0.08	9.97	0.09	0.93
LN foráneo	19	56	12	55	4	67	1.67	0.25	11.07	0.53	0.60
Diabetes	7	21	4	18	1	17	0.90	0.08	9.97	0.09	0.93
VIH-SIDA	3	9	2	9	1	17	2.00	0.15	26.74	0.52	0.60
Desnutrición	1	3	1	5	0	0	1.10	0.04	30.46	0.06	0.95
Drogas	1	3	1	5	0	0	1.10	0.04	30.46	0.06	0.95
Alcoholismo	3	9	2	9	0	0	0.63	0.03	14.90	0.29	0.78
Ninguna	16	47	11	50	3	50	1.00	0.16	6.08	0.00	1.00
Sx. Antifosfolípídico	1	3	0	0	1	17	12.27	0.44	344.15	1.47	0.14
Otra	1	3	1	5	0	0	1.10	0.04	30.46	0.06	0.95
Nuevo	22	65	17	77	2	33	0.15	0.02	1.05	1.91	0.06
Reingreso	3	9	2	9	1	17	2.00	0.15	26.74	0.52	0.60
Recaída	7	21	3	14	2	33	3.17	0.39	25.58	1.08	0.28
Fracaso	1	3	0	0	1	17	12.27	0.44	344.15	1.47	0.14
Curado	18	53	13	59	2	33	0.39	0.00	1.08	1.91	0.06
Termino Tx	1	3	1	5	0	0	1.10	0.04	30.46	0.06	0.95
Abandono	7	21	4	18	2	33	2.25	0.30	16.85	0.79	0.43
Fracaso	2	6	1	5	1	17	4.20	0.76	145.37	1.75	0.08
Defunción	5	15	3	14	1	17	1.27	0.11	14.95	0.19	0.85
Primario	22	65	18	82	3	50	0.22	0.03	1.54	1.52	0.13
Continua Tx	1	3	1	5	0	0	1.10	0.04	30.46	0.06	0.95
Retrat.	5	15	3	14	1	17	1.27	0.11	14.95	0.19	0.85
Segunda L.	5	15	0	0	2	33	25.0	1.02	613.72	1.97	0.05
< 6 meses	2	6	1	5	1	17	4.20	0.76	145.37	1.75	0.08
6 mes	21	62	17	77	2	33	0.15	0.02	1.05	1.91	0.06
> 6 meses	10	29	4	18	3	50	4.50	0.30	16.85	0.79	0.43

Nota: RM: razón de momios; IC 95%: intervalo al 95% de confianza; Z: estadístico Z; P: nivel de significancia estadística. Valores estadísticamente significativos resaltados en negritas.

4.4.3 Asociación entre linajes y mutaciones asociadas a drogorresistencia

Los aislados de linajes LAM, Ghana y Cameroon no presentaron mutaciones asociadas a drogorresistencia. El linaje que presentó más mutaciones fue el Beijing, con ocho mutaciones asociadas a drogorresistencia para los fármacos H, R y S; le siguió el linaje S, con siete mutaciones asociadas a drogorresistencia para los fármacos H, R, Z y E (Figura 22, Tabla XX).

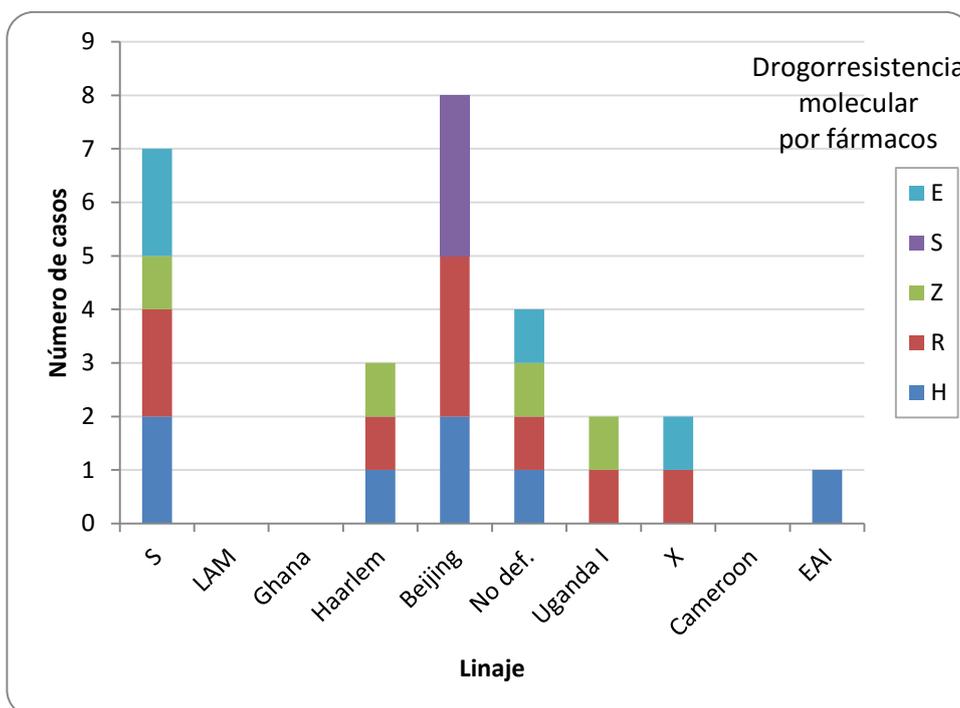


Figura 22. Número de aislados que presentaron mutaciones, clasificados por linaje y drogorresistencia molecular por fármaco de primera línea. Linajes tomados de García-Ortiz (2013).

Tabla XX. Número de aislados de acuerdo al linaje determinado por MIRU-VNTR 12, indicando el número de mutaciones en los genes asociados a drogoresistencia para los fármacos de primera línea.

Linajes	No. Aislados		Sin mutaciones		DROGORRESISTENCIA MOLECULAR POR FÁRMACO										TOTAL MUTACIONES
	No.	%	No.	%	H	%	R	%	Z	%	S	%	E	%	
S	6	18.2	3	13.6	2	28.6	2	22.2	1	25.0	0	0.0	2	50.0	7
LAM	6	18.2	6	27.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0
Ghana	6	18.2	6	27.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0
Haarlem	4	12.1	3	13.6	1	14.3	1	11.1	1	25.0	0	0.0	0	0.0	3
Beijing	4	12.1	1	4.5	2	28.6	3	33.3	0	0.0	3	100	0	0.0	8
No def.	2	6.1	1	4.5	1	14.3	1	11.1	1	25.0	0	0.0	1	25.0	4
Uganda I	2	6.1	1	4.5	0	0.0	1	11.1	1	25.0	0	0.0	0	0.0	2
X	1	3.0	0	0.0	0	0.0	1	11.1	0	0.0	0	0.0	1	25.0	2
Cameroon	1	3.0	1	4.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0
EAI	1	3.0	0	0.0	1	14.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1
TOTAL	33	100	22	100	7	100	9	100	4	100	3	100	4	100	27

Nota: Abreviatura de fármacos de acuerdo a Tabla I. Linajes tomados de García-Ortiz (2013).

Al comparar los grupos de aislados sin mutaciones contra el grupo con mutaciones, respecto a sus linajes, no se obtuvieron RMs estadísticamente significativos, sin embargo, el valor de RM más elevado fue para el linaje Beijing, en donde los aislados con mutaciones fueron 7.9 veces más que en los aislados sin mutaciones.

Tabla XXI. Número de aislados de acuerdo al linajes y drogorresistencia molecular por grupo, clasificados de acuerdo a la presencia o ausencia de mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para fármacos de primera línea.

Linajes	No. Total de Aislados		Sin mutaciones		Con alguna mutación		RM	IC 95%		Z	P
		%		%		%		Min	Max		
S	6	18.2	3	13.6	3	27.3	2.4	0.4	14.4	0.9	0.35
LAM	6	18.2	6	27.3	0	0.0	0.1	0.0	2.2	1.5	0.15
Ghana	6	18.2	6	27.3	0	0.0	0.1	0.0	2.2	1.5	0.15
Haarlem	4	12.1	3	13.6	1	9.1	0.6	0.1	6.9	0.4	0.71
Beijing	4	12.1	1	4.5	3	27.3	7.9	0.7	87.3	1.7	0.09
No def.	2	6.1	1	4.5	1	9.1	2.1	0.1	37.1	0.5	0.61
Uganda I	2	6.1	1	4.5	1	9.1	2.1	0.1	37.1	0.5	0.61
X	1	3.0	0	0.0	1	9.1	6.4	0.2	171.4	1.1	0.27
Cameroon	1	3.0	1	4.5	0	0.0	0.6	0.0	16.6	0.3	0.78
EAI	1	3.0	0	0.0	1	9.1	6.4	0.2	171.4	1.1	0.27
TOTALES	33	100	22	100	11	100					

Nota: Linajes tomados de García-Ortiz (2013). RM: razón de momios; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; Z: estadístico Z; P: nivel de significancia.

Al comparar los grupos de aislados sin mutaciones contra el grupo de TB-DR + TB-PR respecto a sus linajes, no se obtuvieron RMs estadísticamente significativos y las RMs más elevadas se obtuvieron para los linajes EAI y X, aunque de estos linajes solo se encontró un aislado para cada uno (Tabla XXIII).

Tabla XXII. Número de aislados de acuerdo al linaje y drogorresistencia molecular agrupando los que no presentaron mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para fármacos de primera línea y los clasificados TB-DR + TB-PR molecularmente.

Linajes	No. Total de Aislados		Sin mutaciones		TB-MR+PR		RM	IC 95%		Z	P
	No.	%	No.	%	No.	%		Min	Max		
S	6	18.2	3	13.6	1	20.0	1.58	0.13	19.42	0.36	0.72
LAM	6	18.2	6	27.3	0	0.0	0.23	0.01	5.35	0.88	0.38
Ghana	6	18.2	6	27.3	0	0.0	0.23	0.01	5.35	0.88	0.38
Haarlem	4	12.1	3	13.6	0	0.0	0.51	0.23	11.36	0.43	0.67
Beijing	4	12.1	1	4.5	1	20.0	5.25	0.27	102.43	1.09	0.27
No def.	2	6.1	1	4.5	0	0.0	1.30	0.04	30.46	0.06	0.95
Uganda I	2	6.1	1	4.5	1	20.0	5.25	0.27	102.43	1.09	0.27
X	1	3.0	0	0.0	1	20.0	15.00	0.52	430.50	1.58	0.11
Cameroon	1	3.0	1	4.5	0	0.0	1.30	0.04	30.46	0.06	0.95
EAI	1	3.0	0	0.0	1	20.0	15.00	0.52	430.50	1.58	0.11
TOTALES	33	100	22	100	5	100					

Nota: Linajes tomados de García-Ortiz (2013). RM: razón de momios; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; Z: estadístico Z; P: nivel de significancia.

Al comparar los grupos de aislados sin mutaciones contra el grupo de TB-MDR respecto a sus linajes, no se obtuvieron RMs estadísticamente significativo. Aunque fue notorio que el RM más elevado fue para el linaje Beijing, con una RM de 10.5, con una significancia estadística de $P=0.08$ (Tabla XXIII).

Tabla XXIII. Número de aislados de acuerdo al linaje y drogorresistencia molecular agrupando los que no presentaron mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para fármacos de primera línea y los clasificados TB-MDR molecularmente.

Linajes	No. Total de Aislados		Sin mutaciones		TB-MDR		RM	IC 95%		Z	P
		%		%		%		Min	Max		
S	6	18.2	3	13.6	2	33.3	3.17	0.4	25.6	1.1	0.29
LAM	6	18.2	6	27.3	0	0.0	0.20	0.0	4.0	1.1	0.29
Ghana	6	18.2	6	27.3	0	0.0	0.20	0.0	4.0	1.1	0.29
Haarlem	4	12.1	3	13.6	1	16.7	1.27	0.1	15.0	0.2	0.85
Beijing	4	12.1	1	4.5	2	33.3	10.50	0.8	145.4	1.8	0.08
No def.	2	6.1	1	4.5	1	16.7	4.20	0.2	79.3	1.0	0.34
Uganda I	2	6.1	1	4.5	0	0.0	1.10	0.0	30.5	0.1	0.95
X	1	3.0	0	0.0	0	0.0					
Cameroon	1	3.0	1	4.5	0	0.0	1.10	0.0	30.5	0.1	0.95
EAI	1	3.0	0	0.0	0	0.0					
TOTALES	33	100	22	100	6	100					

Nota: Linajes tomados de García-Ortiz (2013). RM: razón de momios; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; Z: estadístico Z; P: nivel de significancia.

4.4.4 Asociación de la drogorresistencia detectada por características fenotípicas (sensibilidad farmacológica) y moleculares (mutaciones)

De los 33 aislados analizados con drogorresistencia farmacológica para al menos uno de los fármacos de primera línea, sólo 11 presentaron alguna mutación en los genes asociados a drogorresistencia, siendo todas las mutaciones no sinónimas. Tres de las cinco mutaciones detectadas en el gen *pncA* (H57R, G105V y G150D) no habían sido reportadas con anterioridad en la base de datos “TB Drug Resistnace Mutation Database” generada por Sandgren et al. (2009). Estas nuevas mutaciones confirieron drogorresistencia a los aislados que las poseían.

Para determinar el grado de asociación entre las mutaciones detectadas con la drogorresistencia farmacológica, se calculó la RM para cada uno de los genes, el IC al 95% y la significancia estadística P (Tabla XXIV).

Tabla XXIV. Análisis de asociación entre drogorresistencia fenotípica y molecular para los siete genes asociados a drogorresistencia para los cinco fármacos de primera línea.

Fármaco	Abreviatura	Gen asociado a drogorresistencia	Resist.		Sens.		Total de aislados analizados	RM	IC		P	Sensibilidad	Especificidad	Exactitud	VPP	VPN
			con mutación	sin mutación	con mutación	sin mutación			Mín	Máx						
Isoniacida	H	<i>inhA</i>	2	28	0	3	33	0.61	0.02	15.57	0.77	0.40	1.00	0.91	1.00	0.90
		<i>katG</i>	5	25	0	3	33	1.51	0.07	33.62	0.79	0.63	1.00	0.91	1.00	0.89
Rifampicina	R	<i>rpoB</i>	8	22	1	2	33	0.73	0.06	9.16	0.81	0.80	0.96	0.91	0.89	0.92
Pirazinamida	Z	<i>pncA</i>	2	22	2	7	33	0.32	0.04	2.70	0.29	0.22	0.92	0.73	0.50	0.76
Estreptomina	S	<i>rpsL</i>	1	23	0	9	33	1.21	0.05	32.49	0.91	0.10	1.00	0.73	1.00	0.72
		<i>rrS</i>	2	22	0	9	33	2.11	0.09	48.27	0.64	0.18	1.00	0.73	1.00	0.71
Etambutol	E	<i>embB</i>	2	24	2	5	33	0.21	0.02	1.85	0.16	0.29	0.92	0.79	0.50	0.83

Ninguno de los valores de RM fue estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) indicando *a priori* que no hay una asociación entre los polimorfismos y la drogorresistencia. Por otro lado, la especificidad del método molecular para detectar drogorresistencia resultó ser igual o mayor a 0.92 para todos los genes, siendo de 1.0 para H y S en los dos genes asociados en cada caso (*inhA* y *katG* para H y *rpsL* y *rrS* para S). Esto indica que al detectar una mutación en estos genes hay una muy alta probabilidad de que la cepa sea drogorresistente. La sensibilidad, sin embargo, resultó

ser muy baja (≤ 0.8) para todos los genes, e incluso menor a 0.5 para los genes *inhA*, *pncA*, *rpsL*, *rrS* y *embB*. Los valores de asociación estadística aquí obtenidos deben ser tomados con cautela, ya que una debilidad de esta investigación es el bajo número de aislados con drogorresistencia farmacológicas con que se contó, lo cual se refleja en la presencia de ceros en la Tabla XXIV.

5 DISCUSIÓN

El bajo número de casos en los que se contó con información de sensibilidad farmacológica (33 aislados) limitó la detección de asociaciones estadísticamente significativas entre las variables sociodemográficas, clínicas y moleculares. Sin embargo, se pudieron detectar tendencias en algunas variables, y sobre todo, reportar las mutaciones asociadas a drogorresistencia en las cepas circulantes en Baja California. Será necesario seguir monitoreando la presencia de cepas drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* en la región y sus características moleculares, como son polimorfismos y linajes de las cepas, para poder determinar asociaciones entre las diversas variables que sirvan de base para la detección, manejo y control de las cepas drogorresistentes en esta región.

5.1 Identificación las mutaciones presentes en los genes asociados a drogorresistencia contra fármacos de primera línea, *inhA* y *katG* (*isoniacida*), *rpoB* (*rifampicina*), *pncA* (*pirazinamida*), *rpsL* y *rrS* (*estreptomycinina*) y *embB* (*etambutol*), en aislados de *M. tuberculosis* drogorresistente provenientes de Baja California.

Las mutaciones identificadas para los siete genes asociados a drogorresistencia a fármacos de primera línea de los aislados analizados en este estudio, ya han sido descritas en la literatura, con excepción de tres mutaciones en el gen *pncA* (Tabla XI), dos de ellas en el aislado **C020** (codones G105V y G150D) y la otra en el aislado **C031** (codón H57R). La mutación en el promotor (nucleótido C -39T) del gen *inhA*, aunque no aparece en la base de datos "TB Resistnace Mutation Database" (Sandgren et al., 2009), fue reportada por Zhang et al. (2005) en una cepa proveniente de China. En nuestro estudio se detectó esta mutación en el aislado **C177** (Tabla IX), el cual corresponde a un varón de 48 años que nació y radica en Baja California, ingresado como "caso nuevo" en 2010, al que se le administró un tratamiento primario por 6 meses, pero egresó como "abandono". En la prueba de sensibilidad farmacológica resultó tener una cepa TB-MDR, y resistencia para los cinco fármacos de primera línea, sin embargo, solo se detectó la mutación en el nucleótido C -39T de la región promotora del gen *inhA*, la cual se asoció a drogorresistencia para H, el linaje de esta cepa fue EAI (Tabla VI).

De los aislados con mutaciones nuevas, el aislado **C020**, de linaje Haarlem, corresponde a un varón de 27 años nacido y radicado en Baja California Sur, diagnosticado con TB en 2008 e ingresado como "caso nuevo", al cual se le administró un tratamiento primario por dos meses y se registró con un egreso de "fracaso" (Tabla IV). Este caso ejemplifica un problema que se detectó en algunos registros al

momento de analizar la base de datos epidemiológica, en la cual se evidencia que algunos datos no son debidamente actualizados con oportunidad y se registran situaciones incongruentes, como por ejemplo, que se registre a un paciente como “fracaso” en vez de “abandono”, al haber tomado el tratamiento por tan solo 2 meses, siendo que el tratamiento primario acortado estrictamente supervisado (TAES) dura al menos 6 meses. Posiblemente se detectó drogorresistencia y por eso se suspendió el TAES, pero no se registró debidamente esta información en el expediente. Respecto a la drogorresistencia farmacológica, la cepa fue resistente a los cinco fármacos de primera línea, sin embargo, solo se detectaron mutaciones en los genes *rpoB* e *inhA*, las cuales ya fueron reportadas previamente. Para el gen *inhA*, la mutación S94A ha sido reportada previamente por Lee et al. (2000) en la base de datos “TB drug resistance mutation database” (Sandgren et al., 2009). Sin embargo, al revisar esta publicación, se observó que los autores mencionan que en los 24 aislados de Corea del Sur que secuenciaron, no encontraron la mutación S94A que esperaban detectar, sino que detectaron una sustitución de T por C en la región promotora del gen *inhA*, sin especificar el sitio preciso.

El aislado **C031** corresponde a un varón de 42 años que nació y radicaba en Baja California, diagnosticado en 2006 e ingresado como “recaída”, al cual se le administró un retratamiento por seis meses y egresó como “defunción” (Tabla IV). Respecto a la drogorresistencia farmacológica, fue resistente a los cinco fármacos de primera línea, pero solo se registró una mutación en el gen *pncA* (codón H57R), la cual no ha sido reportada. El linaje de la cepa fue S (Tabla XV).

Para analizar cada una de las mutaciones detectadas en los genes asociados a drogorresistencia, se comparó con los reportes en México y otras partes del mundo, determinando la distribución y frecuencia de cepas con polimorfismos y generando una tabla para cada gen, mostradas a continuación.

5.1.1 Gen *inhA*

Mutaciones en el gen *inhA* y su región promotora se ha asociado a drogorresistencia para H, como se reporta en varias publicaciones enlistadas en la Tabla XXV (Morlock et al., 2003; Ramaswamy, 2004; Zhang et al., 2005; Hazbón et al., 2006). La mutación reportada como de mayor frecuencia por todos los investigadores es C-15T, sin embargo, en este estudio, se detectaron solo dos mutaciones: la mutación S94A, reportada por Hazbón et al. (2006) en cepas de origen global, y por Morlock et al. (2003) en cepas provenientes de EEUU; y la mutación en el promotor de *inhA* (C-39T), reportada únicamente para un aislado proveniente de China por Zhang et al. (2005) y que no se encuentra registrada en la base de datos “TB Drug Resistance Mutation Database” (Sandgren et al., 2009).

Tabla XXV. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para H con polimorfismo en el gen *inhA* detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.

Autor → año → Localidad →	Presente estudio 2015 Baja California	Hazbón et al. 2006 Global	Zhang et al. 2005 China	Ramaswamy et al. 2004 Monterrey	Morlock et al. 2003 EEUU Rusia Brasil		
C-39T	1		1				
G-17T		4	1		1		
C-15T		31	12	3	19	2	5
T-8A		3					
T-8C		1					
I21T		2	1		2		1
I21V		1	1		2		
I47T		1					
S94A	1	5			2		
I194T		3					
I258T			2				
Total	2	51	18	3	26	2	6
Resistentes a isoniacida	30	48	87	37	15	5	6
%	6.7	106.3	20.7	8.1	173.3	40.0	100.0

Nota: polimorfismos expresados en términos de codones y aminoácidos, excepto en el promotor, donde se expresa la posición del nucleótido corriente arriba del gen en negritas. Mutaciones nuevas resaltadas en rojo.

5.1.2 Gen *katG*

En el gen *katG* se detectaron cinco aislados (C022, C034, C204, C205 y C211) que presentaron alguna mutación; todos los aislados presentaron la misma mutación en el codón S315T, la cual se asoció con drogorresistencia farmacológica y ya había sido reportada por varios autores (Dobner et al., 1997; Morlock et al., 2003; Ramaswamy, 2004; Zhang et al., 2005; Hazbón et al., 2006; Zenteno-Cuevas et al., 2009). En nuestro estudio, correspondieron a los linajes Beijing (aislados C022, C204), S (aislado C034, C211) y un aislado de linaje no definido (C205) (Tabla XV). Esta mutación ha sido la más frecuente en el gen *katG* en México (Ramaswamy, 2004; Zenteno-Cuevas et al., 2009) y a nivel global (Dobner et al., 1997; Morlock et al., 2003; Hazbón et al., 2006), con excepción de China, donde el polimorfismo R463L estuvo presente en 18 aislados, contra 15 aislados con el polimorfismo S315T (Zhang et al., 2005, Tabla XXVI).

Tabla XXVI. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para H con polimorfismo en el gen *katG* detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.

Autor → año → Localidad → Polimorfismo ↓	Presente estudio	Zenteno-Cuevas	Hazbón et al.	Zhang et al.	Ramaswamy et al.	Morlock et al.			Dobner et al.	
	2015 Baja California	2009 Veracruz	2006 Global	2005 China	2004 Monterrey	2003 EEUU	Rusia	Brasil	1997 Sierra Leona	Alemania
R128P			1							
N138D			2							
N138H			1							
N138S			1							
N138T						1				
A172T			2							
E195K						1				
R249C					2					
T275S					1					
G279D								1		
G307E					1					
D311E		2								
A312R		1								
S315R			1							
S315T	5	9	205	15	25	3	5	1	16	11
S315N			9	1						
G316D			1							
G316S			2							
E318V		1								
W321G			1							

Tabla XXVI (continuación)

S331C		1								
W328C		1								
L336P			1							
W341S							1			
ins A1329				1						
R463L				18					4	9
G491C				2						
R515C			1							
R515Y				1						
ins 64pb 1559				1						
L587P			1							
G685R				1						
A727D					1					
D735A			1							
Total	5	12*	230	40*	30*	5	5	3	20	20
Resistentes a Isoniacida	24	91	237	87	25	15	5	6	25	25
%	20.8	13.2	97.0	46.0	120.0	33.3	100.0	50.0	80.0	80.0

Nota: polimorfismos expresados en términos de codones y aminoácidos, excepto en inserciones (ins), donde se expresa la posición del nucleótido en el gen en negritas. * Algunos aislados presentaron más de una mutación.

5.1.3 Gen *rpoB*

Las mutaciones detectadas en el gen *rpoB* fueron todas ya conocidas (Tabla VIII). El codón 531 presentó polimorfismos en 4 aislados de 9 (44.4%). Tres de estos aislados (C194, C205 y C211) presentaron la mutación S531L, y el restante (C020) la mutación S531W. La mutación S531L ya había sido reportada por varios autores a nivel global (Donnabella et al., 1994; Kapur et al., 1994; Qian et al., 2002; Ramaswamy, 2004; Wu et al., 2009; Zenteno-Cuevas et al., 2009; Perdigão et al., 2010; Campbell et al., 2011; Surcouf et al., 2011). En México, las mutaciones en los codones 526 y 531 ya habían sido reportadas en cepas de TB-MDR en el Estado de México (Vázquez-Chacón, 2011), y específicamente la mutación S531L en aislados provenientes del Distrito Federal (Lopez-Alvarez et al., 2010), los cuales además presentaron la misma mutación (S315T) en el gen *katG* que los aislados C205 y C211, lo que les confirió su carácter de ser TB-MDR.

Tabla XXVII. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para R con polimorfismo en el gen *rpoB* detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.

Autor →	Presente estudio	Campbell et al.	Zenteno-Cuevas	Wu et al.	Ramaswamy et al.*	Qian et al.				Kapur et al.
año →	2015	2011	2009	2009	2004	2002				1994
Localidad →	Baja California	Global	Veracruz	China	Monterrey	China	Taiwán	Corea	Japón	EEUU
Polimorfismo ↓										
S509Q			1							
Q510K			2							
L511P				2						4
L511R										1
S512T										1
del 1538-1546										1
Q513K				1		1				2
Q513L				1		3				1
ins 1540TTC										2
ins 1540TTCATG										1
ins 514F							1			
M515I				2						
del 1546-1551										2
D516A						1	2	3		
D516E					1					2
D516G				2						
D516V	1	12	1	1	2					1
D516Y	1		1			3	1	1		2
del 1549-1554										1
Q517H				2						
Q517L			1							

Tabla XXVII (continuación).

518D				1						
L521P			1							
S522F			1							
S522L					3					
L524S			1							
H526C			1		1					
H526D	2		2	8	3					9
H526E										1
H526L				2				2		2
H526N					1			1		
H526P				1						
H526Q										1
H526R				1			1			1
H526Y	1	20		3	5	1	1		1	39
R528P			1							
S531C										1
S531L	3	108	5	60	15	14	7	10	2	36
S531Q							1			
S531W	1		2	2						1
S531Y				1						
L533P				4	1		2			2
I561V					1					
Total	9	140	16	91	33	23	16	17	3	114
Resistentes a rifampicina	30	174	15	97	36	25	20	18	3	121
%	30.0	80.5	106.7	93.8	91.7	92.0	80.0	94.4	100.0	94.2

Nota: polimorfismos expresados en términos de codones y aminoácidos. Ramaswamy (2004) reporta mutaciones en el sistema de numeración de *M. tuberculosis*, por lo que se le sumaron 81 posiciones para comparar con los demás autores en el sistema de *E. coli*.

* Algunos aislados presentaron más de una mutación.

5.1.4 Gen *pncA*

En este estudio se registraron cinco mutaciones diferentes en el gen *pncA*, dos ya han sido reportadas con anterioridad; la mutación en el promotor A-11G (aislado C205 de linaje no definido) reportada por Sreevatsan et al. (1997a) en cepas de procedencia global, sin especificar localidades, y la mutación A102T (aislado C194 de linaje Uganda I) reportada por Marttila et al. (1999) para cepas de Rusia. En nuestro estudio, todas las mutaciones en el gen *pncA* se asociaron con drogorresistencia determinada mediante MGIT 960. Dos aislados (C020 de linaje Haarlem y C031 de linaje S) presentaron mutaciones aún no reportadas que también se asociaron a drogorresistencia farmacológica (Tabla XI). En aislados provenientes de la región fronteriza entre México y Estados Unidos, específicamente entre los estados de Texas y Tamaulipas, McCammon et al. (2005) reportaron 33 mutaciones no sinónimas en el gen *pncA* para cepas resistentes a Z, pero ninguna de ellas coincidió con las detectadas en nuestro estudio. En el estado de Veracruz, (Cuevas-Córdoba et al., 2013b) detectaron 18 polimorfismos, 4 inserciones y 4 deleciones en el gen *pncA* en cepas drogorresistentes de *M. tuberculosis*, ninguna de las cuales coincidió con los cinco diferentes polimorfismos detectados en nuestro estudio. Es notoria la gran variabilidad en los polimorfismos reportados por diversos autores, no solo a nivel internacional, sino aún a nivel nacional para el gen *pncA* (Sreevatsan et al., 1997a; McCammon et al., 2005; Cuevas-Córdoba et al., 2013b).

Tabla XXVIII. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para Z con polimorfismo en el gen *pncA* detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.

Autor → año → Localidad → Polimorfismo ↓	Presente estudio 2015 Baja California	Cuevas-Córdoba et al. 2013 Veracruz	Chiu et al. 2011 Taiwán	Marttila et al. 1999 Rusia	Scorpio et al. 1997 USA	Sreevatsan et al. 1997 Global
T-12G				1		
A-11G	1			1		2
del 11 pb en Inicio			1		2	
A3S					1	
I5S					1	
D8Y				1		
del C28					1	
Q10K				1		
Q10PARO				1		
D12A		2			1	
D12N					1	
L19P						1
V17G				1		
G23A			1			

Tabla XXVIII (continuación)

del G70						7
del G71					1	
A26G					1	
del C84						
A28V			1			
D33A			1			
del C104					1	
Y41PARO						1
V45A			1			
V45G			1			
T47A		1				11
T47S				1		
D49G				1		
D49H		1				
D49V				1		
H51Q					1	
P54L		1	1			
P54T						1
ins C168			1			
D56C			1			
H57D						2
H57P			2			
H57R	1					
F58L			1			
P62Q			1			
D63A		1				
S66P				1		
W68G		1				
W68L						1
P68R					2	
del ACC207			1			
H71Y		1	1			
C72R					1	
G75G		2				
T76A			1			
T76P		1				1
P83R			1			
L85P			1		2	8
F94P						2
F94S		1				
K96E				1		
K96N					1	
K96R		4				
G97D			1			
T100A			1			
A102T	1				1	
A102V		1			2	
Y103C			1			
Y103PARO					1	
G105V	1					
N112Y			2			
L116R				1		
W119R						1
L120P		7				
R121P						1
V125D				1		
V125F		1				

Tabla XXVIII (continuación)

del 11 pb en 379-389				1		
ins AGGTCGATG388						4
del G391					1	
ins T393						1
G132D			1			
G132S			1		2	
I133T				1		
A134V			1			
ins C403						1
T135A			1			
H137P					1	
H137R						2
del TG416					1	
del G443					1	
C138Y						
V139A			2			1
V139L	1				2	
G141P				2	1	
T142K					1	
T142M					1	
A143P	1					
R148C			1			
del 8 pb 446					1	
G150D	1					
R154G				1		
R154T			1			
del C475					1	
T160K		1				
T160P				2		
A161P				1		
A171P					1	
ins 5 pb 518					1	
L172P		1				
T177P			1			
C184Y			1			
Total Aislados	4*	27*	29*	31*	30	48
Resistentes a pirazinamida	24	42	36	36	30	67
%	16.7	64.3	80.6	86.1	100.0	71.6

Nota: polimorfismos expresados en términos de codones y aminoácidos, excepto en inserciones (ins) y deleciones (del), donde se expresa la posición del nucleótido en el gen en negritas. Las mutaciones nuevas se resaltan en rojo. *Algunos aislados presentaron más de una mutación.

5.1.5 Gen *rpsL*

Para el gen *rpsL* sólo se detectó una mutación (K43R) en el aislado C023, la cual había sido reportada por varios autores (Nair et al., 1993; Dobner et al., 1997; Ramaswamy, 2004; Tracevska et al., 2004; Sun et al., 2010; Cuevas-Córdoba et al., 2013a) y estuvo asociada a drogorresistencia farmacológica para S. La cepa fue linaje Beijing, lo que coincide con lo reportado por Sun et al. (2010), quienes detectaron que este mismo polimorfismo fue el más frecuente en 92 aislados (89%) provenientes de Singapur y que además se asoció fuertemente al linaje Beijing (RM=10; IC 95% entre 3.48 y 34.1). En México, en el estado de Veracruz, fue reportada esta misma mutación en 12 aislados con drogorresistencia para S (Cuevas-Córdoba et al., 2013a), aunque no se reportó el linaje de dichos aislados. En Monterrey también fue reportada esta mutación en seis aislados resistentes a S, siendo el único polimorfismo detectado en ese estudio para *rpsL* (Ramaswamy, 2004). La Tabla XXIX contrasta los polimorfismos detectados por los autores mencionados, siendo notorio que el polimorfismo en K43R del gen *rpsL* fue el más frecuente en todos los estudios, a pesar de provenir de cepas de muy diversas localidades y en diferentes años, lo que muestra la poca variabilidad que *M. tuberculosis* presenta en este gen.

Tabla XXIX. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para S con polimorfismo en el gen *rpsL* detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.

Autor →	Presente estudio	Cuevas-Córdoba et al.	Sun et al.	Ramaswamy et al.	Tracevska et al.	Dobner et al.	
año →	2015	2013	2010	2004	2004	1997	
Localidad →	Baja California	Veracruz	Singapur	Monterrey	Latvia	Sierra Leona	Alemania
Polimorfismo ↓							
K43R	1	12	55	6	40	5	10
K88R		4	8			1	1
K88Q		2	1				1
Total	1	18	64	6	40	6	12
Resistentes a Estreptomicina	24	91	102	25	66	25	25
%	4.2	19.8	62.7	24.0	60.6	24.0	48.0

Nota: polimorfismos expresados en términos de codones y aminoácidos.

5.1.6 Gen *rrS*

Para el gen *rrS*, que se ha asociado también a resistencia contra S, detectamos un solo polimorfismo (nucleótido A513C) que se presentó en dos aislados (C022 y C204), ambos correspondiendo a cepas TB-MDR de linaje Beijing. Este polimorfismo fue reportado por Dobner et al. (1997) para aislados de Sierra Leona y Alemania. También fue reportado por Sun et al. (2010) en Singapur en dos aislados de linaje Beijing y uno EAI. En Latvia se reportó esta misma mutación, además del polimorfismo C516T (Tracevska et al., 2004), que no detectamos en nuestro estudio en BC, pero que sí fue reportada por Ramaswamy et al. (2004) en aislados de Monterrey. En este último estudio detectaron 5 polimorfismos en *rrS* que no detectamos en BC. En el estado de Veracruz se reportó para ocho aislados el polimorfismo A513C como el más frecuente (30.8% de aislados resistentes a S) en *rrS*, aunque reportaron siete polimorfismos más que no detectamos en BC (Cuevas-Córdoba et al., 2013a). En la

Tabla XXX se contrastan los polimorfismos detectados por diferentes autores en diferentes localidades para el gen *rrS*.

Tabla XXX. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para S con polimorfismo en el gen *rrS* detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.

Autor →	Presente estudio	Cuevas-Córdoba et al.	Sun et al.	Ramaswamy et al.	Tracevska et al.	Dobner et al.	
año →	2015	2013	2010	2004	2004	1997	
Localidad →	Baja California	Veracruz	Singapur	Monterrey	Latvia	Sierra Leona	Alemania
Polimorfismo ↓							
G189A				1			
G426T				1			
A483T		2					
A485G		2					
C491T				3		2	0
G496A		2					
A513C	2	8	3		11	1	2
C516T		6	2	1	5		1
C795T		6					
C870T		3					
A905G							1
A906T							1
A907C		3					
T1238C				3			

Total	2	26	5	9	16	3	5
Resistentes a Estreptomicina	24	91	102	25	26	25	25
%	8.3	28.6	4.9	36.0	61.5	12.0	20.0

Nota: polimorfismos expresados en términos de nucleótidos y su posición en el gen.

5.1.7 Gen *embB*

Para el gen *embB* solo se detectaron dos mutaciones diferentes. Una de ellas (M306I) se presentó en los aislados C034, C035 y C211. Esta mutación se asoció a drogorresistencia para E en los aislados C034 y C211, de linaje S, mas no en el C035, de linaje X; ya había sido reportada por varios autores en cepas de diversas localidades (Sreevatsan et al., 1997b; Ramaswamy, 2004; Hazbón et al., 2005; Cuevas-Córdoba et al., 2015; Roberto Zenteno-Cuevas, 2015). La otra mutación se detectó en el aislado C205 en el mismo codón (M306V), pero codificando para el aminoácido valina; se asoció a drogorresistencia farmacológica para E, previamente reportada por Shi et al. (2011) y Gandhi et al. (2013), entre otros. El linaje de este último fue “no definido” (García-Ortiz, 2013).

Tabla XXXI. Número de aislados con drogorresistencia farmacológica para E con polimorfismo en el gen *embB* detectados por investigadores de diferentes partes y en diferentes años.

Autor →	Presente estudio	Zenteno-Cuevas et al.	Cuevas-Córdoba et al.	Hazbón et al.	Ramaswamy et al.	Sreevatsan et al.
año →	2015	2015	2015	2005	2004	1997
Localidad →	Baja California	Veracruz	Veracruz	Global	Monterrey	Global
Polimorfismo ↓						
F285L						1
M306I	3	3	9	58	10	15
M306V	1	3	13	35	1	13
M306L				7	1	2
F320L			7			
D328G		2	2			
del C977			3			
D328G			1			
F330L		1	1			
F330V						1
G406A					1	
G406D					2	
T630I						1
Total	4	9	36	100	15	32
Resistentes a Etambutol	26	ND	61	108	18	ND
%	15.4	ND	59.0	92.6	83.3	ND

Nota: Polimorfismos expresados en términos de codones y aminoácidos, excepto en delecciones, donde se expresa en términos de nucleótidos.

5.2 Determinación de la asociación entre la drogorresistencia detectada por características fenotípicas (sensibilidad farmacológica) y moleculares (mutaciones) en los aislados de *M. tuberculosis* drogorresistentes de Baja California.

Es importante resaltar, que la mayoría de los aislados con drogorresistencia farmacológica (21/33, 63.6%) fueron resistentes a los cinco fármacos de primera línea. Se debe considerar que se hacen pruebas de sensibilidad farmacológica sólo en los casos en los que el tratamiento primario administrado ha mostrado no ser efectivo después de un periodo razonable de tiempo o en casos en los que hay sospecha de drogorresistencia por alguna otra causa, como puede ser el contacto con otro paciente infectado con alguna cepa drogorresistente.

Los resultados de este estudio muestran que para los genes *embB* y *pncA* el valor predictivo positivo (VPP) es de tan solo 0.5, aunque para los genes asociados a drogorresistencia para H (*inhA* y *katG*) y para S (*rpsL* y *rrS*) el VPP=1, que es lo ideal. Altos VPP indican una alta probabilidad de que la cepa sea drogorresistente al presentar mutaciones. Por otro lado, el valor predictivo negativo (VPN) fue mayor a 0.9 sólo para *rpoB*. Bajos VPN reflejan alta probabilidad de ser una cepa drogorresistente, aun cuando no se presente la mutación.

Basados en estos resultados del análisis de asociación entre la drogorresistencia farmacológica y molecular, la detección de drogorresistencia mediante la determinación de polimorfismos no sería aconsejable como único método en Baja California, pues a pesar de tener buena especificidad, se tendría un alto porcentaje de falsos negativos que deberían ser confirmados por otro método, como el MGIT 960.

En las referencias consultadas se reportan diferentes grados de discrepancia entre la resistencia farmacológica y los polimorfismos detectados en los genes asociados con drogorresistencia (Hazbón et al., 2005; Zenteno-Cuevas et al., 2009; Surcouf et al., 2011), lo cual indica que se requiere más investigación sobre los mecanismos que causan la drogorresistencia y es fundamental detectar las mutaciones más frecuentes en cada región, ya que puede haber una gran variabilidad entre los polimorfismos circulantes en diferentes partes, como se evidenció, por ejemplo, en el gen *katG*, en el que la mutación más frecuente reportada por Zhang et al. (2005) en China fue R463L, siendo que el resto de las investigaciones en otras partes del mundo reportaron S315T como la mutación más frecuente. Otro ejemplo muy extremo es el del gen *pncA*, en el cual se ha detectado una gran variabilidad en

los polimorfismos que presenta, siendo diferentes para todas las investigaciones que se revisaron (Scorpio et al., 1997; Sreevatsan et al., 1997a; Marttila et al., 1999; Chiu et al., 2011; Cuevas-Córdoba et al., 2013b).

Una factor que puede contribuir a las discrepancias entre el método molecular y el MGIT 960, es la relativa cercanía de la concentración crítica con la concentración mínima inhibitoria (CMI), necesaria para determinar actividad antimicobacteriana, dando como resultado una clasificación errónea de la susceptibilidad o resistencia de un aislado y, como consecuencia, una baja reproducibilidad de las pruebas de sensibilidad. Además de la dificultad técnica, las condiciones de pH, la temperatura y el tiempo de incubación podrían afectar los resultados de las pruebas (Secretaría de Salud, 2010). Las discrepancias detectadas entre ambos métodos nos llevan a recomendar que las concentraciones críticas utilizadas para la determinación de drogorresistencia a los fármacos de primera línea en el LTBT sean revisadas, para evitar que haya un alto número de falsos positivos, lo que aparentemente podría ser la causa de la poca asociación entre ambos métodos en nuestra investigación.

5.2.1 Mutaciones que no confirieron drogorresistencia.

En este estudio, se detectaron cuatro aislados que a pesar de presentar alguna mutación no sinónima en el gen correspondiente, fueron sensibles al fármaco:

- **Aislado C034** en el gen *rpoB*, mutación en codón **D516Y** (nucleótido G1303T), reportada por Kapur et al. (1994) y Zenteno-Cuevas et al.(2009) como drogorresistente a R (Tabla XXVII).
- **Aislado C035** en el gen *embB*, mutación en codón **M306I** (nucleótido G918A), reportada por varios autores como drogorresistente a E (Tabla XXXI).
- **Aislado C194** en el gen *pncA*, mutación en codón **A102T** (nucleótido G304A), reportada por Marttila et al. (1999) como drogorresistente a Z (Tabla XXVIII).
- **Aislado C205** en los genes *pncA* y *embB*. La mutación en *pncA* se detectó en el promotor (nucleótido **A-11G**), reportada por Marttila et al. (1999) como drogorresistente para Z. La mutación en *embB* se detectó en el codón **M306V** (nucleótido A916G), reportada por Sreevatsan et al. (1997b) y otros autores como drogorresistente para E, aunque Hazbón et al. (2005) reporta que el 37% de los aislados que analizaron con esta mutación fueron sensibles a E (Tabla XXXI).

El hecho de detectar cepas con mutaciones no sinónimas en genes asociados a drogorresistencia que aparentemente no confieren drogorresistencia fenotípica a las cepas, ha sido reportado por varios autores (Hazbón et al., 2005; Campbell et al., 2011; Engström et al., 2012; Maha Farhat et al., 2015; Roberto Zenteno-Cuevas, 2015), lo que hace pensar que hay otros factores aún no detectados que contribuyen a la drogorresistencia o que hacen sinergia con éstas mutaciones para conferirla. Esto evidencia la necesidad de más investigación al respecto con el objeto de identificar estos factores y los mecanismos que confieren la drogorresistencia a estas cepas.

Por otro lado, diversos autores han evaluado el desempeño del método MGIT 960 para la detección de drogorresistencia, con resultados variables (Tortoli et al., 2002; Siddiqi et al., 2012). En un metanálisis, que incluyó 10 estudios diferentes, Cruciani et al. (2004) determinaron una sensibilidad promedio de 81.5% y una especificidad de 99.6%. Se ha reportado una discordancia importante para el fármaco Z, dando un alto porcentaje (42%) de falsos positivos (Chedore et al., 2010), por lo que se debe tener precaución al tomar el método MGIT 960 en la determinación de drogorresistencia, en especial para este fármaco.

5.3 Determinación de la asociación entre los linajes por MIRU-VNTR 12 loci y las mutaciones de genes asociados a drogorresistencia a los cinco fármacos de primera línea.

Los linajes con mayor frecuencia en este estudio fueron LAM, S y Ghana (6 aislados, 18.2% cada uno). De estos, los aislados LAM y Ghana no presentaron ninguna mutación en los genes asociados a drogorresistencia. Sin embargo, tres de los seis aislados (50%) de linaje S presentaron alguna mutación. Dos de estos (aislados C034 y C211) presentaron los mismos polimorfismos en los genes *katG* (S315T) y *embB* (M306I) y ambos se asociaron a drogorresistencia. Ambos aislados presentaron también una mutación en el gen *rpoB*; la del aislado C211 (S531L) se asoció con drogorresistencia para R, más la del aislado C034 (D516Y) no. Esto contrasta con lo reportado por Zenteno-Cuevas et al. (2009), quienes detectaron un caso en Veracruz drogorresistente para R con esta misma mutación y con lo reportado por Kapur et al. (1994) con 2 casos epidemiológicamente relacionados con drogorresistencia en Texas, EEUU. En la investigación realizada por Saunders et al. (2011) en el Reino Unido, dieron seguimiento mediante secuenciación de los genes *katG* y *rpoB*, a un paciente VIH negativo infectado originalmente con una cepa

drogosensible a H y R, con mala adherencia al tratamiento. Después de 9 meses de tratamiento, detectaron drogorresistencia a H, conferida por una mutación recién adquirida en *katG* (S315T). Tres meses después, detectaron además, drogorresistencia para R, conferida por otra mutación recién adquirida en *rpoB* (D516Y). Curiosamente, esta misma mutación presentada por el aislado C034 de la presente investigación no mostró asociación con drogorresistencia para R. Esto muestra la complejidad y gran adaptabilidad que presenta *M. tuberculosis* y la necesidad de más investigación sobre los mecanismos involucrados en la drogorresistencia de estos microorganismos.

Los aislados con mutaciones en *inhA* correspondieron únicamente a cepas de los linajes Haarlem (aislado C020) y EAI (aislado C177) (Tabla XV). La mutación del aislado C020 (S94A) ya había sido reportada por varios autores (Lee et al., 2000; Morlock et al., 2003; Hazbón et al., 2006) asociada a drogorresistencia para H. La mutación en el promotor del gen *inhA* (C-39T) del aislado C177, no había sido reportada con anterioridad y se asoció a drogorresistencia para H, por lo que habría que vigilar en estudios subsecuentes si se trata de una cepa que ha surgido exclusivamente en Baja California o si se reportan casos con esta mutación en otras localidades, ya que fue de linaje Haarlem, el cual fue reportado como predominante en Veracruz (Pérez-Martínez, 2013) y ha sido reportado, junto con el linaje Beijing, como altamente asociado a drogorresistencia con una RM=1.7, IC 95% entre 1 y 2.9, en pacientes menores a 13 años en Sudáfrica (Marais et al., 2006). En nuestra investigación, el único linaje con una asociación estadísticamente significativa con mutaciones en el gen *inhA* fue el linaje EAI (RM=63, IC 95% entre 1.73 y 2275, P=0.02).

La mutación S315T fue la única detectada en el gen *katG* y se asoció a drogorresistencia en todos los casos (5 aislados: C022, C204, C205, C034 y C211). Dos de estos aislados fueron linaje Beijing (C022 y C204), dos linaje S (C034 y C211) y uno de linaje no definido. La mutación S315T en *katG* se ha reportado a nivel global como la más frecuente en este gen (Dobner et al., 1997; Morlock et al., 2003; Ramaswamy, 2004; Hazbón et al., 2006; Zenteno-Cuevas et al., 2009). En Sudamérica se reportó en cepas de linaje Beijing en Venezuela (Aristimuño et al., 2007). Cepas TB-MDR de este linaje se han reportado también en otros países latinoamericanos, como Colombia (Murcia et al., 2010). En México, se han detectado cepas de linaje Beijing en Veracruz (Zenteno-Cuevas et al., 2013), Estado de México

(Vázquez-Chacón, 2011; Zenteno-Cuevas et al., 2013) San Luis Potosí (López-Rocha et al., 2013) y Puebla (Martínez-Gamboa et al., 2008). De estos, el reporte de Vázquez-Chacón (2011) corresponde a una cepa TB-MDR con resistencia para los cinco fármacos de primera línea, proveniente de un varón de Tlalnepantla, Estado de México. Zhang et al. (2005), detectó otra mutación (R463L) como la más frecuente China asociada al linaje Beijing; estuvo presente en 18 aislados, contra 15 con la mutación S315T. Fue notorio en este estudio que cuando ésta mutación se asociaba con mutaciones en el promotor del gen *inhA* (C-15T o C-39T), la CMI para H aumentaba hasta 16 µg/mL. La mutación R463L también fue reportada para aislados en Brasil (Cardoso et al., 2004), pero no ha sido reportada en Norteamérica. En nuestra investigación, ningún linaje tuvo una asociación estadísticamente significativa con mutaciones en el gen *katG*.

Los linajes de los aislados con mutaciones en *rpoB* fueron muy variados, correspondiendo a Beijing (aislados C022, C023 y C204), linaje S (aislados C034 y C211), linaje X (aislado C035), linaje Haarlem (aislado C020), linaje Uganda I (aislado C194), y linaje no definido (aislado C205) (Tabla XV). Todas las mutaciones en este gen se asociaron con drogorresistencia para R, excepto la mutación D516Y en el aislado C034, de linaje S. El linaje Beijing fue el único que presentó una asociación significativa con mutaciones en *rpoB* (RM=11.5, IC 95% entre 1.01 y 131.29, P=0.05), mostrando la tendencia reportada por otros autores para el linaje Beijing, de presentar drogorresistencia para R (Qian et al., 2002; Jiao et al., 2007; Wu et al., 2009).

Los aislados con mutaciones en el gen *pncA* no se asociaron a ningún linaje en particular. De los cuatro aislados con polimorfismo en *pncA*, el aislado C020 fue linaje Haarlem, el aislado C031 fue linaje S, el aislado C194 fue linaje Uganda I y el aislado C205 fue de linaje no definido. En la revisión de trabajos realizados por otros investigadores con cepas de diversas partes del mundo, fue notoria la gran variabilidad de polimorfismos detectados, sin presentarse alguna mutación puntual como la más frecuente entre las diferentes regiones del mundo (Scorpio et al., 1997; Sreevatsan et al., 1997a; Marttila et al., 1999; Chiu et al., 2011; Cuevas-Córdoba et al., 2013b). En nuestra investigación, ningún linaje tuvo una asociación estadísticamente significativa con mutaciones en el gen *pncA*.

El aislado C023 fue el único con mutación en el gen *rpsL* y fue de linaje Beijing. La mutación que presentó fue K43R, la cual se asoció con drogorresistencia para S. El paciente en particular proviene del estado de Chiapas y llevaba radicando en BC entre 1 y 5 años al momento de la generación de la base de datos. Aunque fue el único caso

en este estudio, concuerda con lo reportado por Sun et al. (2010), quienes determinaron una asociación significativa con el linaje Beijing (RM=10.88, IC 95% entre 3.48 y 34.1) para cepas de Singapur. Lipin et al. (2007) reportaron también 33 aislados resistentes a S en Moscú, que presentaron la misma mutación en *rpsL* (K43R), estando presente en el 75% de los aislados de linaje Beijing. Al estar este genotipo presente en la región de BC, y haberse detectado en un paciente que migró recientemente (menos de 5 años) desde Chiapas, sería recomendable mantener una vigilancia epidemiológica en estos dos estados respecto a la presencia de cepas Beijing con drogorresistencia para S. En nuestra investigación, ningún linaje tuvo una asociación estadísticamente significativa con mutaciones en el gen *rpsL*.

El otro gen que se ha asociado a drogorresistencia contra S es el gen *rrS*. Los dos aislados con mutación en *rrS* (C022 y C204) presentaron la mutación en el nucleótido A513C y fueron linaje Beijing. El aislado C204 proviene de un paciente nacido en BC y el C022 de uno nacido en Sinaloa, pero que llevaba radicando en BC más de 5 años. Esta misma mutación fue detectada por Sun et al. (2010) en 3 aislados con resistencia para S, de los cuales 2 fueron linaje Beijing. En una investigación previa, Sun et al. (2007) reportaron asociaciones significativas entre el linaje Beijing tanto en cepas TB-MDR (n=41, RM=2.66, IC 95% entre 1.28 y 5.50), como drogorresistencia a R (n=48, RM=2.88, IC 95% entre 1.44 y 5.76) y drogorresistentes a S (n=103, RM=3.35, IC 95% entre 1.99 y 5.62). Contrastando con esto, Lipin et al. (2007) reportaron la presencia de la mutación A513C en el gen *rrS* en cepas provenientes de Moscú para el 100% de 10 aislados de linaje LAM con resistencia contra S. La mutación en el gen *rrS* que los aislados de linaje Beijing de dicho estudio presentaron, fue en otra posición (C516T, solo en el 17% de los aislados Beijing). Dicha mutación no fue detectada en nuestro estudio para ningún linaje, y ningún aislados LAM presentó mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia para los cinco fármacos de primera línea. Esto muestra que las asociaciones entre mutaciones puntuales con ciertos linajes puede variar considerablemente entre diferentes regiones, y demuestra la importancia de realizar más investigación al respecto. En nuestra investigación, el único linaje con una asociación estadísticamente significativa con mutaciones en el gen *rrS* fue el Beijing (RM=59, IC 95% entre 2.2 y 1599, P=0.02).

Las mutaciones en el gen *embB* se han asociado a resistencia contra E (Sreevatsan et al., 1997b). En algunas investigaciones (Hazbón et al., 2005; Cuevas-Córdoba et al., 2015) se han determinado asociaciones entre las mutaciones en el gen *embB* con la predisposición de la cepa a presentar drogorresistencia a un número

creciente de antibióticos. Nuestros datos muestran que de los cuatro aislados que presentaron alguna mutación en el gen *embB*, dos fueron linaje S (aislados C034 y C211) y presentaron la misma mutación (M306I), que se asoció con drogorresistencia para E. El aislado C211 fue además clasificada tanto farmacológica como molecularmente como TB-MDR, al presentar mutaciones en los genes *katG* (S315T) y *rpoB* (S531L). El aislado C034 fue clasificada farmacológicamente como TB-PR (resistente a H y E), pero molecularmente como TB-MDR, al presentar mutaciones tanto en *katG* (S315T) como en *rpoB* (D516Y). Curiosamente, el aislado C035 presentó también la misma mutación en el gen *embB* (M306I), pero fue de linaje X y no se asoció con drogorresistencia para E, pero esta cepa fue farmacológicamente TB-MDR (resistente a H y R) a pesar de no presentar mutaciones en los genes *inhA* y *katG* (asociados a drogorresistencia para H). El aislado C205 fue de linaje no definido y presentó una mutación diferente en el mismo codón de *embB* (M306V), la cual no se asoció a drogorresistencia para E, pero el aislado fue tanto farmacológica como molecularmente TB-MDR, presentando mutaciones en *katG* (S315T) y en *rpoB* (S531L). Aunque el número de aislados con mutaciones en *embB* en nuestra investigación fue de solo cuatro, y no es suficiente como para sacar conclusiones sólidas, concuerdan con los resultado de los estudios de Hazbón et al. (2005) y Cuevas-Córdoba et al. (2015). Aunque el estudio de Cuevas-Córdoba et al. (2015) fue realizado en cepas provenientes de México (Veracruz), no detectaron cepas de linaje S, como ocurrió en nuestro estudio en BC. En nuestra investigación, ningún linaje tuvo una asociación estadísticamente significativa con mutaciones en el gen *embB*.

En resumen, se reportan tres asociaciones estadísticamente significativas entre mutaciones en genes asociados a drogorresistencia y linajes determinados por MIRU-VNTR de 12 loci (Tabla XXXII).

Tabla XXXII. Asociaciones estadísticamente significativas entre mutaciones y linajes obtenidos mediante MIRU-VNTR de 12 loci.

Linaje	Gen	Polimorfismo asociado	RM	IC 95%		P
				Min	Max	
Beijing	<i>rpoB</i>	H526D	11.5	1.01	131	0.05
	<i>rrS</i>	A513C*	59.0	2.18	1599	0.02
EAI	<i>inhA</i>	C-39T*	63.0	1.73	2295	0.02

Nota: RM=razón de momios; IC 95%= intervalo de confianza al 95%; P= significancia estadística.
* Polimorfismos expresados en términos de nucleótidos. Linajes tomados de García-Ortiz (2013).

5.4 Determinación de la asociación entre las características epidemiológicas, linajes y las mutaciones identificadas en los genes analizados en los aislados de *M. tuberculosis* drogorresistentes de Baja California.

No hubo asociaciones estadísticamente significativas entre los grupos de drogorresistencia y las variables sociodemográficas. El tamaño de la muestra no permitió que se detectaran dichas asociaciones. Es importante realizar estudios con un número mayor de muestras para poder evaluar si hay variables que se asocian a la drogorresistencia en la población de Baja California. Desafortunadamente, no se hacen con regularidad pruebas de sensibilidad farmacológica para pacientes de nuevo ingreso, sino hasta que hay una sospecha de drogorresistencia cuando el tratamiento primario no está siendo efectivo, lo que limita el número de casos para los que se dispone de esta información.

6 CONCLUSIONES

Se detectaron cuatro aislados que presentaron mutaciones en genes asociados a drogorresistencia, pero que en las pruebas de sensibilidad farmacológica fueron sensibles al fármaco en cuestión. Estas fueron:

- **Aislado C034** en el gen *rpoB*, mutación en codón **D516Y** (nucleótido G1303T)
- **Aislado C035** en el gen *embB*, mutación en codón **M306I** (nucleótido G918A).
- **Aislado C194** en el gen *pncA*, mutación en codón **A102T** (nucleótido G304A).
- **Aislado C205** en los genes *pncA* y *embB*. La mutación en *pncA* se detectó en el promotor (nucleótido **A-11G**). La mutación en *embB* se detectó en el codón **M306V** (nucleótido A916G).

Esto muestra la complejidad del fenómeno de drogorresistencia, sugiriendo que debe haber otros factores que deben coincidir con la presencia de los polimorfismos para conferir drogorresistencia a las micobacterias, por lo que aún se deben realizar investigaciones en este sentido para detectar dichos factores, que pudieran ser mutaciones en otros genes relacionados.

El gen *inhA* presentó dos polimorfismos (nucleótido C-39T y codón T280G), cada uno se presentó en tan solo un aislado. El polimorfismo en el promotor (C-39T) solo se había reportado en China y el del codón T280G en estudios realizados en Estados Unidos y a nivel global. En el presente estudio ambos polimorfismos se asociaron a drogorresistencia para isoniacida (H).

El gen *katG* presentó un único polimorfismo en 5 aislados diferentes (codón S315T), el cual ya había sido reportado como el más frecuente en este gen en diversos estudios a nivel global. En el presente estudio se asoció a drogorresistencia farmacológica para isoniacida (H) en el 100% de los casos.

El gen *rpoB* fue el que presentó un mayor número de polimorfismos (9). La mutación en el codón S531L fue la más frecuente (3 aislados), seguida del codón H526D (2 aislados), y con un solo aislado para las mutaciones D516V, D516Y, H526Y y S531W. Todas se asociaron a drogorresistencia farmacológica contra rifampicina (R).

Se detectaron mutaciones nuevas únicamente en el gen *pncA* (codones H57R, G105V y G150D). Las mutaciones G105V y G150D se presentaron en el mismo aislado (C020). Estas mutaciones se asociaron a drogorresistencia para pirazinamida

(Z). Otras dos mutaciones fueron detectadas sin asociarse a drogorresistencia farmacológica (nucleótido A-11G y codón A102T). Este gen presenta una gran variedad de polimorfismos que varían mucho entre localidades diferentes, por lo que no es posible utilizar una mutación puntual como marcador de drogorresistencia. En el presente estudio, el 50% de los aislados con mutación en *pncA* fueron sensibles a pirazinamida (Z).

El gen *rpsL* solo presentó un polimorfismo (K43R) en tan solo un aislado; éste se asoció a drogorresistencia contra estreptomina (S). Este polimorfismo ha sido reportado a nivel global como el más frecuente, por lo que es un buen marcador de drogorresistencia para S.

El gen *embB* presentó dos polimorfismos en el codón 306 (M306V y M306I). La sustitución de metionina por isoleucina confirió resistencia contra etambutol (E) para dos aislados de linaje S, mas no para un tercer aislado de linaje X, sugiriendo que hay diferencias genéticas entre los linajes que pueden favorecer o no a la drogorresistencia. Las evidencias muestran, que además de asociarse a drogorresistencia para E, mutaciones en este gen se asocian con la propensión de las cepas a presentar resistencia para otros fármacos. La detección de mutaciones en los genes *rpoB* y *katG* en los aislados con polimorfismos en *embB* refuerza esta hipótesis en la presente investigación.

Se detectaron asociaciones estadísticamente significativas de las mutaciones en los genes *rpoB* (codón H526D, RM=11.5, IC 95% 1.01-131, P=0.05) y *rrs* (nucleótido A513C, RM=59 , IC 95% 2.2-1599, P=0.02) con aislados de linaje Beijing.

Se detectó asociación estadísticamente significativa de la mutación en el nucleótido C-39T del gen *inhA* (RM=63 , IC 95% 1.73-2295, P=0.02) con aislados de linaje EAI.

La administración de tratamiento con fármacos de segunda línea ha sido oportuna por parte del personal de la Clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana (CTBT), logrando la curación de pacientes con cepas de TB-MDR. El 100% de los pacientes a los que se les administró tratamiento con fármacos de segunda línea egresó como curado.

Es importante continuar la investigación sobre la drogorresistencia en Baja California para poder diseñar estrategias que abatan la alta incidencia y mortalidad de esta enfermedad en el estado.

7 LITERATURA CITADA

- Allix-Béguet C, Fauville-Dufaux M, Supply P. 2008. Three-Year Population-Based Evaluation of Standardized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 46:1398-1406.
- Allix C, Supply P, Fauville-Dufaux M. 2004. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clin. Infect. Dis.* 39:783-789.
- Araya P, Velasco M, Tognarelli J, Arias F, Leiva T, Sccapatticio A, Alviz P, Fernández J. 2011. Detección de mutaciones asociadas a cepas multidrogo resistente de *Mycobacterium tuberculosis* en Chile. *Revista médica de Chile* 139:467-473.
- Aristimuño L, España M, Guilarte A, Ramirez C, Rojas J, Gavin P, Lopez-Calleja AI, Lezcano MA, Revillo MJ, et al. 2007. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W genotype in Venezuela. *Journal of Medical Microbiology* 56:1707-1708.
- Bakshi CS, Shah DH, Verma R, Singh RK, Malik M. 2005. Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Veterinary Microbiology* 109:211-216.
- Bakshi CS, Shah DH, Verma R, Singh RK, Malik M. 2007. Corrigendum to "Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR"[*Vet. Microbiol.* 109 (2005) 211–216]. *Veterinary Microbiology* 123:282.
- Bloom BR. 1994. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. ASM Press.
- Bodmer T, Zürcher G, Imboden P, Telenti A. 1995. Mutation position and type of substitution in the beta-subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 35:345-348.
- Bojorquez-Chapela I, Bäcker CE, Orejel I, López A, Díaz-Quiñonez A, Hernández-Serrato MI, Balandrano S, Romero M, Téllez-Rojo Solís MM, et al. 2013. Drug resistance in Mexico: results from the National Survey on Drug-Resistant Tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 17:514-519.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, et al. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:3684-3689.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, et al. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC microbiology* 6:23.

- California Department of Public Health. 2009a. Report on Tuberculosis in California, 2008. Available from:
http://www.cdph.ca.gov/data/statistics/Documents/TB_Report_2008.pdf
- California Department of Public Health. 2009b. Border Health Status, Report to the Legislature 2006-2008. Available from:
<http://www.cdph.ca.gov/programs/Documents/Border%20Health%20Status%20Report%202006-08.pdf>
- Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, Hooks DP, Cowan LS, Plikaytis BB, et al. 2011. Molecular Detection of Mutations Associated with First- and Second-Line Drug Resistance Compared with Conventional Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2032-2041.
- Cardoso-Oelemann M, Diel R, Vatin V, Haas W, Rüsck-Gerdes S, Loch C, Niemann S, Supply P. 2007. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive- unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 45:691-697.
- Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite CQ, Sato DN, de Lourdes Shikama M, et al. 2004. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates obtained in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48:3373–3381.
- Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT. 1991. IS6110: conservation of sequence in the Mycobacterium tuberculosis complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol. Cell. Probes* 5:73-80.
- Caws M, Drobniowski FA. 2001. Molecular Techniques in the Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis and the Detection of Drug Resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 953b:138–145.
- Chedore P, Bertucci L, Wolfe J, Sharma M, Jamieson F. 2010. Potential for Erroneous Results Indicating Resistance When Using the Bactec MGIT 960 System for Testing Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to Pyrazinamide. *J. Clin. Microbiol.* 48:300-301.
- Chiu Y-C, Huang S-F, Yu K-W, Lee Y-C, Feng J-Y, Su W-J. 2011. Characteristics of pncA mutations in multidrug-resistant tuberculosis in Taiwan. *BMC Infectious Diseases* 11:240.
- CodonCode Corporation. 2015. CodonCode Aligner. Available from:
<http://www.codoncode.com/index.htm>
- Consejo Nacional de Población. 2009. Cifras XII Censo General de Población y Vivienda. Available from: <http://www.conapo.gob.mx/00cifras/proy/localidad.xls>
- Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT. 2002. Variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.* 40:1592-1602.

- Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. 2004. Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 42:2321-2325.
- Cuevas-Córdoba B, Cuellar-Sánchez A, Pasissi-Crivelli A, Santana-Álvarez CA, Hernández-Illezcas J, Zenteno-Cuevas R. 2013a. rrs and rpsL mutations in streptomycin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 46:30–34.
- Cuevas-Córdoba B, Eusebio DMJ, Almaraz-Velazco R, Muñiz-Salazar R, Laniado-Laborin R, Zenteno-Cuevas R. 2015. Mutation at embB 306, a potential marker for the identification of multidrug resistance associated with ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*:AAC.00117-15.
- Cuevas-Córdoba B, Xochihua-González SO, Cuellar A, Fuentes-Domínguez J, Zenteno-Cuevas R. 2013b. Characterization of pncA gene mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Mexico. *Infection, Genetics and Evolution* 19:330-334.
- Cuevas-Córdoba B, Zenteno-Cuevas R. 2010. Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 28:621-628.
- Dankner WM, Davis CE. 2000. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics* 105:E79.
- Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I, Sola C, Zozio T, et al. 2012. SITVITWEB—a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* 12:755–766.
- Dickman KR, Nabyonga L, Kateete DP, Katabazi FA, Asiimwe BB, Mayanja HK, Okwera A, Whalen C, Joloba ML. 2010. Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. *BMC Infect. Dis.* 10:349.
- Dobner P, Bretzel G, Rüscher-Gerdes S, Feldmann K, Rifai M, Löscher T, Rinder H. 1997. Geographic variation of the predictive values of genomic mutations associated with streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular and Cellular Probes* 11:123-126.
- Donnabella V, Martiniuk F, Kinney D, Bacerdo M, Bonk S, Hanna B, Rom WN. 1994. Isolation of the gene for the beta subunit of RNA polymerase from rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and identification of new mutations. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11:639-643.
- Engström A, Morcillo N, Imperiale B, Hoffner SE, Juréen P. 2012. Detection of First- and Second-Line Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates by Pyrosequencing. *J. Clin. Microbiol.* 50:2026-2033.
- Finken M, Kirschner P, Meier A, Wrede A, Böttger EC. 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the

ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Molecular Microbiology* 9:1239-1246.

Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, Fujiwara PI, Crawford JT, Nivin B, Sharp V, Hewlett D Jr, Brudney K, et al. 1996. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. *JAMA* 276:1229-1235.

Gandhi NR, Weissman D, Moodley P, Ramathal M, Elson I, Kreiswirth BN, Mathema B, Shashkina E, Rothenberg R, et al. 2013. Nosocomial Transmission of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in a Rural Hospital in South Africa. *J Infect Dis.* 207:9-17.

García-García M de L, Valdespino-Gómez JL, Palacios-Martínez M, Mayar-Maya ME, García-Sáncho C, Sepúlveda-Amor J. 1995. Tuberculosis y sida en México. *Salud Pública de México* 37:539-548.

García-Ortiz RA. 2013. Epidemiología molecular de la tuberculosis en Baja California.

García Ramos R, Lado Lado FL, Túnez Bastida V, Pérez Del Molino Bernal ML, Cabarcos Ortiz de Barrón A. 2003. Tratamiento actual de la tuberculosis. *Anales de Medicina Interna* 20:43-52.

Garfein RS, Burgos JL, Rodríguez-Lainz A, Brodine S, Pietrucha A, Rondinelli A, Laniado-Laborin R, Ibarra E, Cañez A, et al. 2011. Latent tuberculosis infection in a migrant agricultural community in Baja California, Mexico. *J Immigr Minor Health* 13:940-947.

Gobierno de Baja California G de BC. 2014. Plan Estatal de Desarrollo Baja California 2014-2019. Available from:
<http://www.bajacalifornia.gob.mx/portal/gobierno/ped/ped.jsp>

Hass WH, Schilke K, Brand J, Amthor B, Weyer K, Fourie PB, Bretzel G, Sticht-Groh V, Bremer HJ. 1997. Molecular analysis of katG gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:1601 - 1603.

Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Billman-Jacobe H, Lavender C, Fyfe J, et al. 2006. Population Genetics Study of Isoniazid Resistance Mutations and Evolution of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:2640-2649.

Hazbón MH, del Valle MB, Guerrero MI, Varma-Basil M, Filliol I, Cavatore M, Colangeli R, Safi H, Billman-Jacobe H, et al. 2005. Role of embB codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49:3794–3802.

Hernández-Hernández F de la C, Rodríguez MH. 2009. Avances biotecnológicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México* 51:s424-s438.

- Heym B, Alzari PM, Honoré N, Cole ST. 1995. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 15:235-245.
- Huard RC, Fabre M, De Haas P, Lazzarini LC., van Soolingen D, Cousins D, Ho JL. 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of bacteriology* 188:4271–4287.
- Huard RC, de Oliveira Lazzarini LC, Butler WR, Van Soolingen D, Ho JL. 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *Journal of clinical microbiology* 41:1637–1650.
- Jiao WW, Mokrousov I, Sun GZ, Li M, Liu JW, Narvskaya O, Shen AD. 2007. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China. *Chin Med J (Engl)* 120:814-819.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, et al. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35:907-914.
- Kapur V, Li L-L, Iordanescu S, Hamrick MR, Wanger A, Kreiswirth BN, Musser JM. 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *Journal of clinical microbiology* 32:1095–1098.
- Kim S, Park Y, Kim W, Lee S, Ludgerus Chang C, Kang S, Kang C. 2003. Molecular analysis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47:497-502.
- Kocagoz T, Saribas Z, Alp A. 2005. Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* 43:6015–6019.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. 1997. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Laniado-Laborín R, Muñoz-Salazar R, García-Ortiz RA, Vargas-Ojeda AC, Villa-Rosas C, Oceguera-Palao L. 2014. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from patients with tuberculosis in Baja California, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution* 27:1–5.
- Laszlo A, de Kantor IN. 1994. A random sample survey of initial drug resistance among tuberculosis cases in Latin America. *Bull World Health Organ* 72:603-610.
- Lee H, Cho SN, Bang HE, Lee JH, Bai GH, Kim SJ, Kim JD. 2000. Exclusive mutations related to isoniazid and ethionamide resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 4:441-447.
- Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, Shinnick TM. 2007. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-

- resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clinical microbiology and infection* 13:620–626.
- Longo, Fauci, Kasper, Hauser, Jameson, Loscalzo eds. 2012. *Harrison's principles of internal medicine*. 18th ed. New York: McGraw-Hill.
- Lopez-Alvarez R, Badillo-Lopez C, Cerna-Cortes JF, Castillo-Ramirez I, Rivera-Gutierrez S, Helguera-Repetto AC, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Samper S, et al. 2010. First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance. *BMC Microbiology* 10:82.
- López-Rocha E, Juárez-Álvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso-Moreno L, Ortega-Aguilar F, Hernández-Nieto J, Enciso-Moreno JA, López-Revilla R. 2013. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in San Luis Potosí, México. *BMC Research Notes* 6:172.
- Maha Farhat, Razvan Sultana, Megan Murray. 2015. Large Scale Sequencing of Genetic Determinants of Drug Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*: Implications for Diagnostic Design. En: A96. MOLECULAR MYCOBACTERIOLOGY: HOST AND BACILLUS. American Thoracic Society International Conference Abstracts. American Thoracic Society. p A2184-A2184. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2015.191.1_MeetingAbstracts.A2184
- Marais BJ, Victor TC, Hesselning AC, Barnard M, Jordaan A, Brittle W, Reuter H, Beyers N, Helden PD van, et al. 2006. Beijing and Haarlem Genotypes Are Overrepresented among Children with Drug-Resistant Tuberculosis in the Western Cape Province of South Africa. *J. Clin. Microbiol.* 44:3539-3543.
- Marín M, De Viedma DG, Ruíz-Serrano MJ, Bouza E. 2004. Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48:4293–4300.
- Martinez-Gamboa A, Ponce-de-Leon A, Galindo-Fraga A, Bobadilla-del-Valle M, Kato-Maeda M, Robertson BD, Young DB, Small PM, Sifuentes-Osornio J. 2008. Molecular Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strains with an Intact *pks15/1* Gene in a Rural Community of Mexico. *Archives of Medical Research* 39:809-814.
- Marttila HJ, Marjamäki M, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, Vasilyef AV, Viljanen MK. 1999. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1764-1766.
- Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P. 2001a. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:1901-1906.
- Mazars E, Lesjean S, Banuls A-L, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P. 2001b. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the national academy of Sciences* 98:1901–1906.

- McCammon MT, Gillette JS, Thomas DP, Ramaswamy SV, Rosas II, Graviss EA, Vijg J, Quitugua TN. 2005. Detection by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of *pncA* Mutations Associated with Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from the United States-Mexico Border Region. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:2210-2217.
- Meier A, Kirschner P, Springer B, Steingrube VA, Brown BA, Wallace RJ, Böttger EC. 1994. Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:381-384.
- Mitchison DA, Nunn AJ. 1986. Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133:423-430.
- Molhuizen HO, Bunschoten AE, Schouls LM, van Embden JD. 1998. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by spoligotyping. *Methods Mol. Biol.* 101:381-394.
- Mo L, Zhang W, Wang J, Weng XH, Chen S, Shao LY, Pang MY, Chen ZW. 2004. Three-Dimensional Model and Molecular Mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG) and Isoniazid-Resistant KatG Mutants. *Microbial Drug Resistance* 10:269-279.
- Morán Moguel MC, Aceves Hernández D, Peña Montes de Oca, Gallegos Arreola G, Flores Martínez SE, Montoya Fuentes H, Figueroa LE, Villa Manzanares L, Sánchez Corona. 2000. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* with polymerase chain reaction in a selected population in northwestern Mexico. *Revista Panamericana de Salud Pública* 7:389-394.
- Morlock GP, Metchock B, Sikes D, Crawford JT, Cooksey RC. 2003. *ethA*, *inhA*, and *katG* Loci of Ethionamide-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:3799-3805.
- Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Infectious Diseases* 186:74–80.
- Murcia MI, Manotas M, Jiménez YJ, Hernández J, Cortès MIC, López LE, Zozio T, Rastogi N. 2010. First case of multidrug-resistant tuberculosis caused by a rare «Beijing-like» genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Bogotá, Colombia. *Infection, Genetics and Evolution* 10:678-681.
- Nair J, Rouse DA, Bai GH, Morris SL. 1993. The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 10:521-527.
- Organización Mundial de la Salud. 2008. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/
- Organización Mundial de la Salud. 2010. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf

- Organización Mundial de la Salud. 2012. WHO | Global tuberculosis report 2012. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html
- Organización Mundial de la Salud. 2013. Global tuberculosis report 2013. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Organización Mundial de la Salud. 2014. Publicaciones sobre Tuberculosis, Definiciones. Available from: <http://www.who.int/tb/publications/2009/airborne/background/definition/es/index.html>
- Organización Mundial de la Salud. 2015. ¿Qué es la tuberculosis y cómo se trata? Organización Mundial de la Salud. Available from: <http://www.who.int/features/qa/08/es/>
- Pagano M, Gauvreau K. 2000. Principles of biostatistics. 2nd ed. Pacific Grove, CA: Duxbury.
- Palma-Nicolás JP, Bocanegra-García V. 2007. Innovative strategies to diagnose and monitor tuberculosis patients. Archivos de Bronconeumología ((English Edition)) 43:225–232.
- Perdigão J, Macedo R, Malaquias A, Ferreira A, Brum L, Portugal I. 2010. Genetic analysis of extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in Lisbon, Portugal. J. Antimicrob. Chemother. 65:224-227.
- Pérez-Martínez DE. 2013. Epidemiología molecular de tuberculosis en Veracruz.
- Pérez-Navarro LM, Fuentes-Domínguez FJ, Zenteno-Cuevas R. 2015. Type 2 diabetes mellitus and its influence in the development of multidrug resistance tuberculosis in patients from southeastern Mexico. Journal of diabetes and its complications 29:77–82.
- Pérez-Navarro LM, Fuentes-Domínguez F, Morales-Romero J, Zenteno-Cuevas R. 2011. Factores asociados a tuberculosis pulmonar en pacientes con diabetes mellitus de Veracruz, México. Órgano Oficial de la Academia Nacional de Medicina de México, AC 147:219–25.
- Peter CR, Schultz E, Moser K, Cox M, Freeman R, Ramirez-Zetina M, Lomeli MR. 1998. Drug-resistant pulmonary tuberculosis in the Baja California-San Diego County border population. West J Med 169:208-213.
- Qian L, Abe C, Lin T-P, Yu M-C, Cho S-N, Wang S, Douglas JT. 2002. rpoB Genotypes of Mycobacterium tuberculosis Beijing Family Isolates from East Asian Countries. J. Clin. Microbiol. 40:1091-1094.
- Quirós-Roldán E, Airolidi M, Moretti F, Carosi G. 2001. Bases moleculares de resistencia de Mycobacterium tuberculosis. Revista de Diagnóstico Biológico 50:200-203.
- Ramaswamy SV. 2004. Genotypic analysis of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Monterrey, Mexico. Journal of Medical Microbiology 53:107-113.

- Roberto Zenteno-Cuevas OX-G. 2015. Mutations conferring resistance to first- and second-line drugs in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in southeast Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Rodwell TC, Kapasi AJ, Moore M, Milian-Suazo F, Harris B, Guerrero LP, Moser K, Strathdee SA, Garfein RS. 2010. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. *International Journal of Infectious Diseases* 14:e129-e135.
- Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. 2008. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in Binational Communities, United States. *Emerging Infectious Diseases* 14:909-916.
- Romay Z, Arráiz N, Fuenmayor A, Ramírez C, Rojas L, París R. 2012. Detección de la mutación S315T en el gen katG como estrategia para identificación de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a isoniácida en un laboratorio de referencia. *Revista chilena de infectología* 29:607-613.
- Rubio MÁ, Millán S, Sánchez JG, (Project) E del DE y S de los PI de M. 2000. La migración indígena en México. Instituto Nacional Indigenista.
- Said-Fernández S, Becerril-Montes P, Molina-Salinas G, Barrios-García H, Vargas-Villarreal J. 2005. Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes. *Enfermedades Emergentes* 7:13–19.
- Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. 2009. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. *PLoS Med* 6:e1000002.
- Saunders NJ, Trivedi UH, Thomson ML, Doig C, Laurenson IF, Blaxter ML. 2011. Deep resequencing of serial sputum isolates of *Mycobacterium tuberculosis* during therapeutic failure due to poor compliance reveals stepwise mutation of key resistance genes on an otherwise stable genetic background. *Journal of Infection* 62:212-217.
- Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y. 1997. Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41:540–543.
- Secretaría de Salud. 2007. Programa Nacional de Salud 2007-2012. Por un México sano: construyendo alianzas para una mejor salud. Available from: http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/programas/pns_version_completa.pdf
- Secretaría de Salud. 2010. Guía para la atención de personas con tuberculosis resistente a fármacos. Available from: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/guia_tb_mfr_ok.pdf
- Secretaría de Salud. 2011. Guía práctica para la atención de la tuberculosis en niños, niñas y adolescentes. Available from: http://web.ssaver.gob.mx/saludpublica/files/2011/10/guia_pediaticaultimo.pdf
- Secretaría de Salud. 2012. Situación actual de la Tuberculosis en el Mundo, México y Veracruz. Avances y desafíos. Available from:

<http://web.ssaver.gob.mx/saludpublica/files/2012/03/01-SIMPOSIO-VERACRUZ.pdf>

Secretaría de Salud. 2013. NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis.

Secretaría de Salud. 2014. Situación actual de la tuberculosis en México. Available from:
<http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/SituacionActualTbMexico.pdf>

SEDESOL. 2007. Programa de Desarrollo Urbano de los Centros de Población. Available from: Gobierno del estado de Baja California

Shi D, Li L, Zhao Y, Jia Q, Li H, Coulter C, Jin Q, Zhu G. 2011. Characteristics of embB mutations in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Henan, China. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:2240-2247.

Siddiqi S, Ahmed A, Asif S, Behera D, Javaid M, Jani J, Jyoti A, Mahatre R, Mahto D, et al. 2012. Direct Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis for Rapid Detection of Multidrug Resistance Using the Bactec MGIT 960 System: a Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology* 50:435-440.

Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Respir Res* 2:164–8.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN, Musser JM. 1996. Characterization of rpsL and rrs mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from diverse geographic localities. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40:1024–1026.

Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM. 1997a. Mutations associated with pyrazinamide resistance in pncA of Mycobacterium tuberculosis complex organisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41:636–640.

Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan XI, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR, Telenti A, Musser JM. 1997b. Ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis: critical role of embB mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41:1677–1681.

Sun Y-J, Lee ASG, Wong S-Y, Heersma H, Kremer K, van Soolingen D, Paton NI. 2007. Genotype and phenotype relationship and transmission analysis of drug-resistant tuberculosis in Singapore. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 11:436-442.

Sun Y-J, Luo J-T, Wong S-Y, Lee ASG. 2010. Analysis of rpsL and rrs mutations in Beijing and non-Beijing streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Singapore. *Clinical Microbiology and Infection* 16:287-289.

Supply P. 2005. Multilocus variable number tandem repeat genotyping of Mycobacterium tuberculosis. Technical Guide [Internet]. Available from:
http://www.researchgate.net/profile/Philip_Supply/publication/265990159_Multilocus_Variable_Number_Tandem_Repeat_Genotyping_of_Mycobacterium_tuberculosis_Technical_Guide/links/5437e5b40cf2027cbb2055e8.pdf

- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsç-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, et al. 2006. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 44:4498-4510.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Soolingen D van, Locht C. 2001. Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *J. Clin. Microbiol.* 39:3563-3571.
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome. *Mol. Microbiol.* 36:762-771.
- Surcouf C, Heng S, Pierre-Audigier C, Cadet-Daniel V, Namouchi A, Murray A, Gicquel B, Guillard B. 2011. Molecular detection of fluoroquinolone-resistance in multi-drug resistant tuberculosis in Cambodia suggests low association with XDR phenotypes. *BMC Infectious Diseases* 11:255.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti MT. 2002. Evaluation of Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to Four Major Antituberculous Drugs: Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB Method and the Agar Plate Method of Proportion. *Journal of Clinical Microbiology* 40:607-610.
- Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. 1999. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 37:3578-3582.
- Tracevska T, Jansone I, Nodieva A, Marga O, Skenders G, Baumanis V. 2004. Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Research in microbiology* 155:830–834.
- UniProtKB/Swiss-Prot. Q08129 (KATG_MYCTU). Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P9WIE4>
- UniProtKB/Swiss-Prot. P0A5Y6 (INHA_MYCTU). Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P0A5Y6>
- UniProtKB/Swiss-Prot. P0A680 (RPOB_MYCTU). Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P0A680>
- Vázquez-Chacón CA. 2011. Caracterización fenotípica y molecular de aislados de Mycobacterium tuberculosis obtenidos durante la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en México durante los años 2008 y 2009. Available from: <http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/9689/1/344.pdf>

- Wada T, Maeda S, Tamaru A, Imai S, Hase A, Kobayashi K. 2004. Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* 42:5277–5285.
- Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, van Soolingen D, Rüsç S, Locht C, et al. 2008. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000160>
- World Health Organization. 2006. WHO. Global tuberculosis control.
- Wright A, Zignol M, Van Deun A, Falzon D, Gerdes SR, Feldman K, Hoffner S, Drobniewski F, Barrera L, et al. 2009. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002–07: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *The Lancet* 373:1861-1873.
- Wu X, Zhang J, Chao L, Liang J, Lu Y, Li H, Yang Y, Liang Y, Li C. 2009. Identification of Rifampin-Resistant Genotypes in *Mycobacterium tuberculosis* by PCR-Reverse Dot Blot Hybridization. *Molecular Biotechnology* 41:1-7.
- Yugueros-Marcos J, Cascón-Soriano A, Sánchez-Salazar M, Hernández-Moral C, Suárez-Ramos S, Smeltzer MS, Naharro-Carrasco G. 1999. Rapid Identification and Typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *aroA* Gene. *Journal of clinical microbiology* 37:570–574.
- Zenteno-Cuevas R, Silva-Hernandez FX, Mendoza-Damian F, Ramirez-Hernandez MD, Vazquez-Medina K, Widrobo-Garcia L, Cuellar-Sanchez A, Muniz-Salazar R, Enciso-Moreno L, et al. 2013. Characterisation of *pks15/1* in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108:718-723.
- Zenteno-Cuevas R, Zenteno JC, Cuellar A, Cuevas B, Sampieri CL, Riviera JE, Parissi A. 2009. Mutations in *rpoB* and *katG* genes in *Mycobacterium* isolates from the Southeast of Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:468–472.
- Zhang M, Yue J, Yang Y, Zhang H, Lei J, Jin R, Zhang X, Wang H. 2005. Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China. *J Clin Microbiol* 43:5477-5482.
- Zhang Y, Mitchison D. 2003. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 7:6–21.
- Zúñiga-Carrasco IR, Caro-Lozano J. 2013. Pacientes con tuberculosis drogorresistente: un reto nacional en los tres niveles de salud. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría [Internet] XXVII*. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revenfinfped/eip-2013/eip133f.pdf>

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1. Encuesta realizada para el estudio epidemiológico de tuberculosis

				
ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE TUBERCULOSIS				
TB 04-I				
I	Afiliación <input type="text"/>			Folio <input type="text"/>
	NOMBRE: _____		CURP: <input type="text"/>	
	<small>Apellido Paterno</small> _____ <small>Apellido materno</small> _____ <small>Nombre (s)</small> _____			
	FECHA DE NACIMIENTO: <input type="text"/>	ESTADO: _____	JURISDICCION: _____	
	<small>(de nacimiento)</small>		<small>(de nacimiento)</small>	
	MUNICIPIO: _____	EDAD: <input type="text"/>	SEXO: <input type="radio"/> M <input type="radio"/> F	
	<small>(de nacimiento)</small>		<small>Años Meses Dias</small>	
	OCUPACION: _____			
	ESCOLARIDAD: _____			
	<small>(Actual o último año aprobado)</small>			
RESIDENCIA ACTUAL				
Calle y Número _____		Colonia _____	Estado _____	Jurisdicción Sanitaria _____
Municipio _____		Localidad _____		
TIPO DE MUNICIPIO: Municipio prioritario TB <input type="checkbox"/>		Municipio población indígena <input type="checkbox"/>	Municipio muy alta migración <input type="checkbox"/>	
Municipio de alta marginación <input type="checkbox"/>		Municipio migración <input type="checkbox"/>	Municipio arranque parejo en la vida <input type="checkbox"/>	
TIEMPO DE RADICAR EN DOMICILIO ACTUAL: <input type="checkbox"/>		Menos de 1 año <input type="checkbox"/>	De 1 a 5 años <input type="checkbox"/>	Más de 5 años <input type="checkbox"/>
II	Clave de la Unidad _____			
	Estado _____	Jurisdicción Sanitaria _____	Municipio _____	Localidad _____
	Institución _____		Nombre (Hospital, Clínica, Centro de Salud, Otros) _____	
	Nombre del Médico Notificante _____		Unidad de Adscripción _____	
III	Fecha de inicio de signos y síntomas <input type="text"/>			
	<small>Día Mes Año</small>			
	Signos y síntomas: _____			

Método de diagnóstico: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1 = Baciloscopia, 2 = Cultivo, 3 = Histopatología, 4 = Clínico, 5 = Radiológico, 6 = Epidemiológico, 7 = Clínico Epidemiológico, 8 = Otros, 9 = Ignorado				
LABORATORIO Y GABINETEZ	ESTUDIO	RESULTADOS	Fecha de solicitud <small>Día/ Mes / Año</small>	Fecha de resultado <small>Día/ Mes / Año</small>
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
1 = Baciloscopia, 2 = Cultivo, 3 = Histopatología, 4 = Rx de tórax, 5 = TAC de cráneo, 6 = PCR, 7 = Citoquímico de LCR, 8 = Otros, Especifique: _____ Resultado de baciloscopia: 1 = BK + (una cruz), 2 = BK ++ (dos cruces), 3 = BK +++ (tres cruces), 4 = BK - (Negativo), 5 = Positivo, 6 = No se realizó, 7 = Muestra inadecuada, 8 = De 1 a 9 bacilos, 9 = Ignorado. Resultado de cultivo y PCR: 1 = Positivo, 2 = Negativo, 9 = Ignorado. Resultado para Rx de Tórax, TAC de cráneo, Histopatología y Citoquímico de LCR: 1 = Con datos sugestivos de TB, 2 = Sin datos sugestivos de TB, 9 = Ignorado. Resultado de otro: 1 = Positivo, 2 = Sugestivo, 3 = Negativo.				

8.2 Anexo 2. Glosario

Abandono: Interrupción del tratamiento durante 30 días o más.

Baciloscopía: Técnica de laboratorio aplicada en el diagnóstico de tuberculosis, que mediante la tinción de Ziehl Neelsen, permite observar en un frotis, Bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR).

Caso de tuberculosis: Persona en quien se establece el diagnóstico de tuberculosis pulmonar o extrapulmonar.

Caso nuevo: Enfermo en quien se establece el diagnóstico de tuberculosis por primera vez y nunca han recibido tratamiento antituberculoso.

Continúa tratamiento: Paciente que continúa recibiendo tratamiento después de seis meses de haberlo iniciado.

Cultivo: Técnica de laboratorio que permite el aislamiento de colonias de *M. tuberculosis* en medio sólido o líquido.

Curación: Caso de tuberculosis que termina su tratamiento, desaparecen los signos clínicos y tiene baciloscopía negativa en los dos últimos meses o cultivo negativo al final del tratamiento.

Defunción por tuberculosis: Defunción en la que la tuberculosis inicia la serie de acontecimientos que llevan a la muerte.

Fracaso de tratamiento: Persistencia de bacilos en la expectoración, o en otros especímenes al término de tratamiento confirmada por cultivo, o a quien después de un periodo de negativización durante el tratamiento, tiene baciloscopía positiva confirmada por cultivo.

Recaída: Paciente con presencia de signos o síntomas con reaparición de bacilos en la expectoración, o en otros especímenes, después de haber egresado del tratamiento por curación.

Reingreso: Enfermo de tuberculosis que reinicia el tratamiento después de haberlo abandonado.

Referido: Paciente que por causa justificada se recibe procedente de otra parte para continuar su tratamiento.

Retratamiento primario: Esquema de tratamiento que se instituye a los pacientes con recaída, fracaso o abandono de un tratamiento primario acortado, comprende la administración de 5 fármacos de primera línea durante 8 meses, dividido en 3 fases HRZES/1HRZE/5H3R3E3.

Retratamiento estandarizado: Esquema de tratamiento que se instituye a un enfermo con fracaso a un esquema de retratamiento primario o con tuberculosis multifarmacorresistente, y es avalado por el Comité Estatal de Farmacorresistencia correspondiente.

Retratamiento individualizado: Esquema de tratamiento que se instituye a un enfermo con tuberculosis multifarmacorresistente (TBMFR) multitratado o con fracaso a un esquema de retratamiento estandarizado, fundamentado en el resultado del estudio de susceptibilidad antimicrobiana. Comprende la administración de un tratamiento con fármacos de segunda línea, la combinación y el número de fármacos será definido por el grupo de expertos en TBMFR.

Término de tratamiento: Caso de tuberculosis que ha completado el esquema de tratamiento, han desaparecido los signos clínicos y no se realizó baciloscopia o cultivo al finalizar el tratamiento.

Traslado: Es el proceso para enviar al paciente para tratamiento y control a otra unidad de salud.

Tratamiento individualizado: Esquema diseñado con base en la historia detallada de los medicamentos antituberculosos recibidos en tratamientos previos y los resultados de las pruebas de sensibilidad farmacológica.

Tratamiento estrictamente supervisado: Tratamiento que administra el personal de salud o personal comunitario capacitado por personal de salud, quien debe confirmar la ingesta y deglución del fármaco para garantizar el cumplimiento del tratamiento.

Tratamiento primario acortado: Al tratamiento que se instituye a todos los casos nuevos. Comprende la administración de cuatro fármacos de primera línea (isoniacida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z) y etambutol (E)) en 60 dosis durante la fase intensiva y dos fármacos en 45 dosis durante la fase de sostén (seis meses) 2HRZE/4H3R3.

Tuberculosis multifarmacorresistente o multidrogorresistente (TB-MDR): Tuberculosis en la cual un microorganismo del complejo *M. tuberculosis* no es susceptible a la acción de isoniacida ni de rifampicina, administradas simultáneamente.

8.3 Anexo 3. Abreviaturas

ADN: Ácido deoxirribonucleico	ODM: Objetivos de Desarrollo del Milenio
Am: Amikacina	Ofx: Ofloxacina
ARN: Ácido ribonucleico	OMS: Organización Mundial de la Salud
ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico	OPS: Organización Panamericana de la Salud
BSL3: Bioseguridad Nivel III	Pto: Protionamida
CTBT: Clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana	PNS: Polimorfismo no sinónimo
Cm: Capreomicina	PP: Polimorfismo en el promotor
Cs: Ciclocerina	PR: Polimorfismo en ADN ribosómico
ds: Desviación estándar	PS: Polimorfismo sinónimo
Dx: Diagnóstico	PSF: Prueba de sensibilidad farmacológica
E: Etambutol	R: Rifampicina
ECS: Escuela de Ciencias de la Salud	Ri: Ribosómico
Eto: Etionamida	S: Estreptomicina
Fq: Fluoroquinolona	Si: Sinónima
H: Isoniacida	TB: Tuberculosis
INEGI: Instituto nacional de estadística y geografía	TB-DR: Tuberculosis drogorresistente (resistente a un solo fármaco)
Km: Kanamicina	TB-PR: Tuberculosis polirresistente (resistente a dos o más fármacos)
LEM: Laboratorio de Epidemiología Molecular	TB-MDR: Tuberculosis multidrogorresistente
Lfx: Levofloxacina	TB-XDR: Tuberculosis con resistencia extendida (o ultrarresistente)
LN: Lugar de nacimiento	Tx: Tratamiento
LR: Lugar de residencia	UABC: Universidad Autónoma de Baja California
Mfx: Moxifloxacina	Z: Pirazinamida
NA: No aplica	
ND: No determinado	
No def.: No definido	

8.4 Anexo 4. Tablas de datos

Tabla XXXIII. Relación de genes amplificados para cada aislado.

Antibiótico / Gen	H / katG	H / inhA	R / rpoB	Z / pncA	S / rpsL	S / rrS	E / embB	Fq / gyrA	TOTALES
AISLADO									
C020	1	1	1	1	1		1		6
C022	1	1	1	1	1	1	1		7
C023	1	1	1		1	1	1		6
C031	1	1	1	1	1		1		6
C032	1	1	1	1	1	1	1		7
C034	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C035	1	1	1		1		1		5
C036	1	1	1	1	1	1	1		7
C038	1	1	1	1	1	1	1		7
C046	1	1	1	1	1	1	1		7
C057	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C062	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C067	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C075	1	1	1	1	1	1	1		7
C078	1	1	1	1	1	1	1		7
C169	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C171	1	1	1					1	4
C172	1	1	1	1	1	1	1		7
C175	1	1	1	1	1	1	1		7
C176	1	1	1	1	1	1	1		7
C177	1	1	1	1	1	1	1		7
C181	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C183	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C184	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C191	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C193	1	1	1	1	1		1	1	7
C194	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C201	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C203	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C204	1	1	1	1	1	1	1	1	8
C205	1	1	1	1	1	1	1		7
C206	1	1	1	1	1	1	1		7
C211	1	1	1		1	1	1	1	7
TOTAL	33	33	33	29	32	28	32	16	236
TOTAL CON MUTACIONES	5	2	9	4	1	2	4	1	28

Nota: Los 1's indican gen amplificado. Espacios vacíos indican que el gen no fue amplificado exitosamente. El color naranja indica presencia de mutación. En los totales por renglón, la intensidad del color indica el grado de completamiento del juego de genes amplificado (8 máximo, 4 mínimo).

Tabla XXXIV. Información de resistencia en cultivo (CULT), mutaciones en los genes asociados a drogorresistencia (MOLEC) de los 5 fármacos de primera línea y egreso.

AISLADO	H		R		Z		S		E		EGRESO
	CULT	MOLEC									
C020	1	1	1	1	1	1	1	ND	1	0	Fracaso
C022	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	Abandono
C023	1	0	1	1	ND	ND	1	1	1	0	Fracaso
C031	1	0	1	0	1	1	1	ND	1	0	Defunción
C032	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Defunción
C034	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	Defunción
C035	1	0	1	1	0	ND	0	ND	0	1	Fracaso
C036	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	Abandono
C038	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	Fracaso
C046	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	Curado
C057	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Defunción
C062	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Termino Tx
C067	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Curado
C075	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Curado
C078	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Abandono
C169	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Abandono
C171	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	Curado
C172	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Curado
C175	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Curado
C176	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Curado
C177	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	Abandono
C181	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Curado
C183	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Abandono
C184	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Curado
C191	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Curado
C193	1	0	1	0	1	0	1	ND	1	0	Curado
C194	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	Fracaso
C201	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Curado
C203	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Curado
C204	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	Abandono
C205	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	Continua Tx
C206	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	Defunción
C211	1	1	1	1	1	ND	1	0	1	1	Fracaso

Nota: . Las celdas amarillas con 1 indican resistencia / mutación. Las celdas azules con 0 indican sensible / sin mutación. Las celdas blancas con ND indican que no se contó con el dato. Abreviatura de los fármacos según la Tabla I.