



Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias

Detección de mutaciones en genes asociados a farmacorresistencia en
Mycobacterium tuberculosis utilizando el método MAMA-PCR

TESIS

Que para obtener el título de

B I Ó L O G O

Presenta:

PAOLA SARITZIA RUIZ TAMAYO

Directora de Tesis:

DRA. RAQUEL MUÑIZ SALAZAR

Ensenada, Baja California

Junio del 2020

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias

Detección de mutaciones en genes asociados a farmacorresistencia en *Mycobacterium tuberculosis*
utilizando el método MAMA-PCR

TESIS
Que para obtener el título de

BIÓLOGO

Presenta:

PAOLA SARITZIA RUIZ TAMAYO



DRA. RAQUEL MUÑOZ SALAZAR

Directora de tesis



Dr. Carlos Alberto Flores López
Sinodal



Dr. Rafael Laniado Laborín
Sinodal



M.C. Ricardo Perea Jacobo
Sinodal

Índice General

Resumen	10
Introducción	11
Antecedentes	14
Objetivos	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos	17
Metodología	18
Aislados clínicos	18
Muestras clínicas.....	18
Técnica de MAMA-PCR para <i>M. tuberculosis</i>	19
Identificación de mutaciones en aislados clínicos.....	19
Secuenciación de Genoma Completo.....	19
Diseño de cebadores.....	20
Estandarización de cebadores	22
Determinación del perfil de farmacorresistencia con GenoType MTBDRsl.....	23
Extracción de ADN de <i>M. tuberculosis</i> de muestras clínicas	24
Identificación molecular de la especie	24
Amplificación por MAMA-PCR en muestras clínicas.....	25
Resultados	26
Estandarización de los cebadores MAMA-PCR en equipo tradicional, aplicado en aislados clínicos	26
Genes asociados a fármacos de primera línea.....	32
Genes asociados a fármacos de segunda línea	32
Estandarización de los cebadores MAMA-PCR en equipos portátiles	35
Determinación del perfil de farmacorresistencia Genotípico/GenoType MTBDRsl	40
Aplicación de la técnica MAMA-PCR en muestras clínicas de pacientes con TB pulmonar	43
Discusión	50
Conclusiones	54
Bibliografía	55
Anexos	60
Anexo de Tablas	63

Índice de Figuras

Figura 1. Diseño de cebadores para el gen *katG* (INH) en *M. tuberculosis*. El primer nucleótido del extremo 3' es donde se presenta la mutación, el segundo nucleótido es el "Mismatch" o desajuste. 20

Figura 2. Amplicones por MAMA-PCR del gen *rpoB*, mutación *H526T* de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 2% (p/v). Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) C346-TB, (2) C352-TB, (3) C575-TB, (4) C505-TB (Positivo mutante), (5) C505-A-TB (mutante) (6) C334-TB (Positivo silvestre), (7) Negativo. (agua nanopura). 33

Figura 3. Amplicones por MAMA-PCR de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 2% (p/v) **A) *katG***, mutación *S315T* de Líneas: (E) Escalera molecular (350 pb); Muestras: (1) C274, (2) C297 y (3) Negativo. **B) *pncA***, mutación *V180G*. Líneas: (E) Escalera molecular (500 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C086 (Mutante) y (4) Negativo. **C) *embB***, mutación *Q497R* Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C052 (Positivo mutante) y (4) Negativo. **D) *gyrA***, mutación *S91P*. Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C053 (Mutante) y (4) Negativo. **E) *rpsL***, mutación *K43R*. Líneas: (E) Escalera molecular (100 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C557-TB (Mutante) y (4) Negativo. **F) *eis***, mutación *P114S*. Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (400 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C223 (Mutante) y (4) Negativo. 34

Figura 4. Amplicones de MAMA-PCR de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 1% (p/v). 38

Figura 5. Amplicones de MAMA-PCR de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 1% (p/v). **A) *rpsL***, Líneas: (E) Escalera molecular (300 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C557 y (4) Negativo. **B) *eis***, Líneas: (E) Escalera molecular (400 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C223 y (4) Negativo. 39

Figura 6. Tiras reactivas del kit GenoType MTBDRsl v.1 Muestras clínicas: (1) 042/18, (2) 1251/18, (3) 1310/18, (4) 1421/18, (5) 1635/18, (6) OMB Mix 3 (9, 10, 11), (7) OMB Mix GenoLyse (9, 10, 11) (8) OMB mix casero (9, 10, 11) y (9) Negativo. 41

Figura 7. Tiras reactivas del kit GenoType MTBDRsl v.1 con muestras del Grupo 1: (1) C053, (2) C075, (3) Negativo. 42

Figura 8. Extracción de ADN de las muestras clínicas de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 1% (p/v). E: Escalera molecular 300 pb Líneas: (E) Escalera molecular (300 pb); Muestras clínicas: (1) 1526/19, (2) 1357/19, (3) 1358/19, (4) 1378/19, (5) 1391/19, (6) 1422/19, (7) 1439/19, (8) 1494/19, (9) 1393/19, (10) 1404/19, (11) 1409/19, (12) 1302/19, (13) 1303/19, (14) 1313/19, (15) 1329/19, (16) 1331/19, (17) 1332/19, (18) 1344/19, (19) 1346/19 y (20) 1338/19. 44

Figura 9. Amplicones de mPCR (diferenciación de especie causante de TB) de muestras clínicas de tuberculosis. Gel de agarosa 2% (p/v). E: Escalera molecular Invitrogen (100 pb). Líneas: (1) 1144/19, (2) 1248/13, (3) 1222/19, (4) 1219/19, (5) 1050/19, (6) Positivo para *M. tuberculosis* (1088/19), (7) 1212/19, (8) 1075/19, (9) 1138/19, (10) Negativo (agua nanopura), (11) Positivo para *M. tuberculosis* (316/19). 45

Figura 10. Amplicones de mPCR (diferenciación de especie) de muestras clínicas de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 2% (p/v). E: Escalera molecular Invitrogen (100 pb). Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras clínicas: (1) 1168/19, (2) 1050/19, (3) 1221/19, (4) 1212/19, (5) 1159/19, (6) 1075/19, (7) 1138/19, (8) 1187/19, (9) 1086/19, (10) 1164/19, (11) 1302/19, (12) 985/19, (13) 1051/19, (14) 1098/19, (15) 1190/19, (16) 982/19, (17) 1049/19, (18) 1273/19 y (19) 1099/19. Positivos para *M. tuberculosis* (+) 1088/19, (+') 308/19 y (-) Negativo (agua nanopura). 46

Figura 11. Amplicones de la región control de *rpoB*, de muestras clínicas incluidas en la plataforma SINAVE Gel de agarosa 2% (p/v). Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) MyMc546, (6) MyMc569, (7) MyMc583, (8) MyMc585, (9) MyMc592, (10) MyMc597, (11) MyMc604, (12) MyMc608, (13) MyMc610, (14) MyMc614, (15) MyMc624, (16) MyMc645, (17) MyMc649, (18) MyMc652E, (19) MyMc692, (20) MyMc700, (21) MyMc702, (23) MyMc704, (24) MyMc705, (25) MyMc706 (26) MyMc707, (27) MyMc723, (28) MyMc740, (29) C334 (Positivo) y (30) Negativo. 47

Figura 12. Amplicones del MAMA-PCR aplicado en muestras clínicas de tuberculosis. Gel de agarosa 2% (p/v). **A) katG:** Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) MyMc546, (6) C274 (positivo silvestre) (7) C211 (positivo Mutante) y (8) Negativo (agua nanopura). **B) rpoB:** Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) MyMc546, (6) C274 (positivo silvestre) (7) C505-TB (Positivo Mutante) y (8) Negativo (agua nanopura). **C) embB:** Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) MyMc546, (6) C274 (positivo silvestre) (7) C052 (Positivo Mutante) y (8) Negativo (agua nanopura). **D) eis:** Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) MyMc546, (6) C223 (Positivo Mutante) (7) C616-TB (positivo Silvestre) y (8) Negativo (agua nanopura). 48

Figura 13. Amplicones del gen *rpoB* y *eis* de muestras clínicas incluidas en la plataforma SINAVE. Gel de agarosa 1% (p/v) **A) rpoB:** Líneas: (E) Escalera molecular (300 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) C505-TB (positivo Mutante), (6) C9334-TB (Silvestre), (7) C616-TB (Silvestre) y (8) Negativo. **B) eis:** Líneas: (E) Escalera molecular (300 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) C334-TB (silvestre), (6) C223 (positivo mutante), (7) C616-TB (positivo Silvestre de *M. tuberculosis*) y (8) Negativo. 49

Índice de Tablas

Tabla 1. Mutaciones que confieren resistencia a fármacos utilizados en el tratamiento antituberculosis de primera y segunda línea.	21
Tabla 2. Perfil del termociclador para PCR de GenoType MTBDRsl v.1	23
Tabla 3. Diseño de 20 pares cebadores MAMA-PCR para <i>M. tuberculosis</i> , para fármacos de primera y segunda línea del tratamiento antituberculosis.	27
Tabla 4. Concentraciones de reactivos utilizados en la reacción de MAMA-PCR.....	28
Tabla 5. Modificaciones en la temperatura de hibridación en termociclador tradicional C1000 Touch Thermal Cycler.	29
Tabla 6. Tiempo de electroforesis para la visualización de los amplicones obtenidos en el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler.	30
Tabla 7. Grupo 1: Aislados clínicos definidos como silvestres y mutantes que han sido utilizados en la estandarización de los cebadores MAMA-PCR.....	31
Tabla 8. Modificaciones en el perfil del termociclador en Mini-PCR.	36
Tabla 9. Tiempo de electroforesis correspondiente a cada gen en Bluegel ®.	37

Anexo de Tablas

Anexo Tabla 1. Genes asociados a los fármacos del primera y segunda línea del tratamiento antituberculosis.	63
Anexo Tabla 2. Cebadores universales utilizados para amplificación de genes asociados a farmacorresistencia de primera y segunda línea en <i>M. tuberculosis</i>	64
Anexo Tabla 3. Condiciones de reactivos para PCR con cebadores universales (Barocio-León, 2016).	65
Anexo Tabla 4. Concentraciones de reactivos utilizados en la reacción de MAMA-PCR.	66

Agradecimientos

A mi madre, Maricela Tamayo; por el apoyo incondicional, por brindarme su amor y comprensión durante toda mi formación académica, por permitirme buscar mis sueños, aunque estos implicaran estar lejos de casa. Te amo.

A mis hermanos Patricia, Carlos, Yesenia y mi prima Alejandra; por siempre estar pendientes de mi educación y apoyarme toda mi vida, gracias por darme el regalo más hermoso que un hermano puede dar; mis sobrinos, Charly, Andy, Sarah, Dom, Paula † y Axel, a quienes amo infinitamente, y que por ellos quiero ser un ejemplo a seguir.

A la Dra. Raquel Muñoz Salazar, mi directora de tesis, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio y de su casa, por enseñarme el camino de la ciencia y ser mi mentora, por brindarme su cariño y amistad sincera.

A las técnicas del laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular, de la Escuela de Ciencias de la Salud de la UABC, las M.C. Arely Paredes y Brenda Bonett, por sus enseñanzas y apoyo durante mi trayecto en el laboratorio.

Al Dr. Carlos Alberto Flores López por todo su apoyo y enseñanzas durante mi formación como Bióloga, al M.C. Ricardo Perea Jacobo por su apoyo en el laboratorio y al Dr. Rafael Laniado Laborín por proporcionar las muestras clínicas para el estudio.

A mis queridos amigos, Alexis Rafael, Eugenia Bonilla, Ricardo Echavarría, Yaneli Hipólito, Saramarén García y mis compañeras de laboratorio Valeria Lucero y Danniela Rosas, por su amistad y cariño sincero, por tantas risas, noches de estudio, noches de fiesta, por su compañía en los mejores días y también en los peores, por su paciencia todos estos años, por motivarme a seguir mis sueños, en fin, por ser mi familia de Ensenada. Finalmente agradezco de todo corazón a mis compañeros de la LXIX generación de Biología de la Facultad de Ciencias de la UABC, porque gracias a ellos la licenciatura ha sido la mejor etapa de mi vida.

En memoria de mi Padre, *Carlos Ruiz Santoyo* †, de mi pequeña Sobrina; *Paula Mabel* † y
de mi querido amigo: *Luis Eduardo Hermosillo* †.

Un fuerte abrazo hasta el cielo; gracias por haber llenado mi vida de alegría y amor.

Hasta siempre.

Esta investigación fue realizada con financiamiento del proyecto:

“Desarrollo de un método múltiplex, económico y rápido para la identificación simultánea de mutaciones responsables de la resistencia a drogas anti-tuberculosas de primera y segunda línea, aplicado directamente en muestras clínicas”.

Numero de proyecto: 2015-01-147

No. de becario: 29452

CONACYT-Problemas Nacionales

Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* siendo un problema de salud a nivel mundial. En el año 2018, la tasa de incidencia de esta enfermedad en el Estado de Baja California fue de 58.3 casos por 100,000 habitantes, reportándose como el estado con mayor incidencia de TB pulmonar en el país. En el presente estudio se aplicó la técnica MAMA-PCR, diseñándose cebadores con base en las mutaciones de resistencia de mayor frecuencia identificadas en aislados clínicos de *M. tuberculosis* de pacientes de Baja California.

Se realizó la estandarización de siete pares de cebadores, cuatro de ellos para mutaciones en genes asociados a medicamentos de primera línea; *rpoB* (RIF) H526T, *katG* (INH) S315T, *embB* (EMB) Q497R y *pncA* (PZA) V180G y tres de ellos para mutaciones en fármacos de segunda línea; *rpsL* (SM) K43R, *eis* (AMK) P114S y *gyrA* (FQ) S91P.

La técnica se aplicó en aislados clínicos de pacientes con TB pulmonar, permitiendo la discriminación alélica de los aislados silvestres y mutantes. Asimismo, la técnica junto a los cebadores diseñados en este estudio se realizó en los equipos portátiles Mini-PCR® y cámara de electroforesis Bluegel®; permitiendo la identificación molecular de *M. tuberculosis* y el perfil de farmacoresistencia en aislados y muestras clínicas de *M. tuberculosis*. El uso de equipos portátiles permite que la técnica se encuentre al alcance de centros de salud alejados de los hospitales y laboratorios estatales, y por lo tanto, más cerca de los pacientes, permitiendo de esta manera desarrollar Puntos de Atención Diagnóstica (Point-of-Care Diagnostics).

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La TB afecta principalmente los pulmones, pero también puede presentarse entre otros sitios (sistema nervioso, huesos, piel, intestinos, genitales y ganglios). Se transmite principalmente por el aire, de una persona a otra a través de gotículas generadas en el aparato respiratorio de pacientes con enfermedad pulmonar activa. Aproximadamente, un tercio de la población mundial está infectada por la bacteria de *M. tuberculosis*. En 2018, 10 millones de personas enfermaron de TB y 1.6 millones murieron por esta enfermedad, lo que equivale a 4,500 decesos por día. Se estima que en 2017 un millón de niños enfermaron y 230,000 niños murieron por TB (World Health Organization 2019).

De manera importante, la resistencia a los fármacos antituberculosis a nivel mundial se ha convertido en un obstáculo significativo para el control y la eventual eliminación de la enfermedad (van der Werf and Sprenger 2014). La OMS, estimó que en el 2017 se presentaron a nivel global 558,000 casos de TB resistente a rifampicina (TB-RR), el fármaco de primera línea más efectivo. De estos, el 82% era TB multifarmacorresistente (TB-MDR), es decir, también presentaba resistencia a por lo menos al segundo fármaco más importante, isoniacida. Sin embargo, principalmente, por falta de acceso a pruebas diagnósticas, solo se reportaron una cuarta parte de los casos estimados (123,000 casos). Consecuentemente, estas personas se encuentran sin tratamiento y siguen dispersando el patógeno. La OMS reporta que aproximadamente 3.3% de los casos nuevos y hasta el 20% de los casos previamente tratados de TB son MDR, y de estos últimos el 10% son cepas extensamente resistentes (TB-XDR), es decir, cepas que son resistentes a todos los fármacos de primera línea, a una fluoroquinolona y a un medicamento inyectable (World Health Organization 2015). La resistencia a fármacos anti-TB (TB-FR) a nivel mundial es un obstáculo significativo para el control y la eliminación de la TB (van der Werf and Sprenger 2014).

Uno de los componentes centrales de la Estrategia para Erradicar la TB post-2015 de la OMS, es el diagnóstico de la TB-DR (World Health Organization 2015), por medio de cultivos microbiológicos (pruebas de susceptibilidad a fármacos, PSF) o bien de tipo molecular. Esto debido a que no existen síntomas o signos clínicos o radiológicos que permitan al médico diagnosticar la presencia y el grado de resistencia. El diagnóstico de la TB-DR requiere de cierto equipamiento en un laboratorio, para realizar pruebas de diagnóstico aprobadas por la OMS. Esto implica incrementar la infraestructura de los laboratorios en todo el país (World Health Organization 2018). La confirmación de la sospecha clínica de resistencia es indispensable para garantizar que los casos sean correctamente diagnosticados y reciban el tratamiento más efectivo de acuerdo con su patrón de resistencia a la mayor brevedad posible. Por ello, es indiscutible que el retraso en el diagnóstico correcto del grado de resistencia se asocia a mayor morbilidad en el nivel individual y a mayor transmisión de cepas resistentes a nivel comunitario.

En México, la mayoría de los casos siguen siendo diagnosticados exclusivamente con base a los resultados de microscopía de expectoración (prueba de Ziehl-Neelsen). Esta técnica, si bien es accesible y de bajo costo, tiene graves limitaciones: su sensibilidad puede ser tan baja como 50%, misma que solo se incrementa conforme progresa la enfermedad (y su consecuente transmisión de la infección en la comunidad). La microscopía tampoco permite distinguir entre las micobacterias ambientales y las especies del complejo de *M. tuberculosis*, como *M. bovis*. Tampoco, permite distinguir entre micobacterias susceptibles y resistentes a los fármacos. La estrategia tradicional para el diagnóstico de TB resistente a fármacos es basada en el método fenotípico de PSF mediante cultivo en diversos medios. La principal limitación de esta estrategia es el prolongado tiempo de espera requerido para obtener resultados, que puede llegar a ser hasta de 6 semanas (World Health Organization 2015). Un problema más importante quizás que esta limitación técnica, es que el número de laboratorios de referencia en el país que pueden realizar pruebas fenotípicas para fármacos de primera y segunda línea es extremadamente limitado, requiriendo el transporte de las muestras a un laboratorio de referencia, lo que constituye una barrera más para la obtención de los resultados de las PSF en forma oportuna. Esto evidentemente reduce el impacto

clínico de los resultados de las PSF, pues los pacientes tendrán forzosamente que ser tratados mientras tanto con esquemas empíricos estandarizados (Hoek et al. 2012).

Actualmente se han reportado 50 genes implicados en la farmacorresistencia de *M. tuberculosis*. La detección de mutaciones que confieren resistencia mediante métodos moleculares es una alternativa rápida y precisa. Sin embargo, las metodologías anteriormente mencionadas, implica de una alta inversión para la compra de los equipos. En el caso del GenXpert, el precio es de aproximadamente de \$ 17,000 dólares sin impuestos y sin considerar los tramites de aduana. La técnica *Mismatch Amplification Mutation Assay* (MAMA-PCR) permite la detección de mutaciones puntuales, (polimorfismos de un solo nucleótido, SNP's) (Alonso et al., 2005). Esta técnica ha sido utilizada con diversas especies de bacterias y virus para la detección de mutaciones que confieren resistencia a fármacos o para la detección de alelos que permite la identificación de los aislados (Sulyok et al., 2018). La técnica de MAMA-PCR, puede implementarse con equipos de bajo costo e instalarse en puntos de atención de diagnóstico (POC, por sus siglas en inglés (Point of Care), el cual es accesible al paciente y proporciona resultados de manera oportuna (García-Basteiro et al., 2018). Existen diferentes POC recomendados por la OMS como son: Xpert MTB/RIF, Xpert MTB/RIF Ultra, pruebas comerciales de flujo lateral de lipoarabinomano (por sus siglas en ingles LF-LAM), pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs) así como la Secuenciación de Nueva Generación (NGS) para la detección de farmacorresistencia (García-Basteiro et al., 2018, Langley et al. 2015).

Este proyecto tiene como meta desarrollar un método directo que se aplique a muestras clínicas, mediante el ensayo MAMA-PCR, con el objetivo de tener un método multiplex que sea rápido, económico y en el punto de atención del paciente, que pueda realizar la identificación de aislados farmacorresistentes sin la necesidad de usar cultivos clínicos.

Antecedentes

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria que fue descubierta en el año de 1882 por el médico y microbiólogo Robert Koch (Koch, 1882). Las principales características de este bacilo radican en su lentitud de crecimiento y reproducción, así como la presencia de una cubierta celular compleja y un estado latente dentro del hospedero (Cole et al., 1998). En su estado latente, *M. tuberculosis* permanece dentro del tejido pulmonar o extrapulmonar infectado y puede producir una parálisis metabólica por la reacción inmune mediada por células T. Este mecanismo permite al sistema inmune controlar la infección, pero no eliminarla y debido al envejecimiento celular o el declive del sistema inmunológico, las bacterias que se encuentran en estado latente pueden ser reactivadas, causando la aparición de la enfermedad, incluso décadas después de adquirir la bacteria (Cole et al., 1998).

Se estima que mueren 1.5 millones de personas anualmente a causa de TB a nivel mundial (World Health Organization; 2019), siendo la principal causa de muertes en humanos por una infección bacteriana. En México la TB es uno de los principales problemas de salud pública, y se ha considerado dentro del Plan Nacional de Salud (PNS) (Secretaría de Salud Pública, 2018).

En 2018 la tasa de incidencia de TB en México fue de 17.7 hab/100,000, mientras que en Baja California fue de 58.3 hab/100,000, tres veces más que la media nacional, reportándose como el estado con mayor incidencia de TB pulmonar en el país (Secretaría de Salud Pública, 2018). En el año 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 1.5 millones de muertes por TB, incluyendo 251,000 casos con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), y 484,000 casos de TB-MDR a nivel mundial (World Health Organization; 2019).

La multifarmacorresistencia (MDR) hace referencia a los aislados bacterianos resistentes a dos de los fármacos de primera línea: RIF e INH, los cuales son utilizados comúnmente en el tratamiento de la enfermedad (Roycroft et al., 2018). Así mismo, existen los aislados ultrafarmacorresistentes (XDR), los cuales incluyen la MDR, además de cualquier fármaco de segunda línea (FQ) y por lo menos, uno de los tres fármacos inyectables: kanamicina (KAM), capreomicina (CAP) o amikacina (AMK), utilizados en el tratamiento antituberculoso (Migliori et al., 2007).

La técnica más efectiva para la detección de mutaciones que confieren o no resistencia a los fármacos es la Secuenciación de Genoma Completo (SGC), la cual, proporciona una vista de todo el genoma de un organismo (Witney et al., 2016). Esta técnica consiste en la construcción de librerías genómicas, la secuenciación de clonas de la librería y el ensamble de estas, con el fin de obtener el genoma lineal del organismo de estudio (Venter et al., 1998). Dado que la resistencia a medicamentos para TB se ha ligado a ciertas mutaciones, esto ha permitido que la secuenciación se enfoque a esas regiones genéticas y que la secuenciación sea una plataforma de gran utilidad (Dolinger et al., 2016). Además, los resultados de SGC son entregados varias semanas antes que los cultivos (Witney et al., 2016). La desventaja de SGC, es el costo (tanto de cómputo, como la plataforma de secuenciación) (Dolinger et al., 2016).

Otros métodos desarrollados para el diagnóstico de resistencia del complejo TB son:

- 1) el ensayo Xpert MTB/RIF el cual fue aprobado por la OMS en 2010 y por la *Food and Drug Administration* (FDA) en 2013, siendo una técnica nueva y automática que es capaz de detectar la resistencia de RIF en un mínimo de 2 horas (Rice, Seifert, Moser, & Rodwell, 2017), en donde se incluye una purificación de las muestras, una amplificación de ADN y la detección de secuencias blanco, utilizando una PCR de tiempo real y tres cebadores para la amplificación del gen *rpoB* y cinco sondas que permiten la identificación de mutaciones (Rice et al., 2017).

El ensayo GenoType MTBDRsl, desarrollado por Hain Lifesciences, permite una rápida identificación de resistencia del MTC frente a medicamentos de primera y segunda línea. Cuenta con sondas específicas para los genes y mutaciones más comunes que confieren la resistencia a fármacos de TB (Gao et al., 2018).

Otra técnica molecular utilizada para la resistencia a fármacos es: Multiplex Allele Specific (MAS-PCR), la cual es un ensayo económico y rápido para la detección de resistencia a KAN; esta técnica detecta la mayoría de las mutaciones al nivel de alelos que, aunque no tiene la resolución necesaria para detectar mutaciones, es una técnica muy útil en el diagnóstico inicial para comenzar una terapia farmacológica (Kumari, Banerjee, & Anupurba, 2018).

Una de las técnicas más innovadoras para la detección de mutaciones puntuales o SNP's es MAMA-PCR. Esta técnica ha sido utilizada en bacterias como: *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* (Alonso et al., 2005b) en *Vibrio cholera* (Morita et al., 2008), *Escherichia coli* (Qiang et al., 2002), y en virus de hepatitis C., (Fonseca-Coronado et al., 2011), con el fin de detectar mutaciones puntuales que confieren resistencia a los fármacos. La identificación de mutaciones implica el uso de cebadores específicos, un cebador sentido o conservado (5'-3') y uno o dos cebadores anti sentido (3'-5') donde se presentará el nucleótido silvestre y el mutante, para desarrollar una PCR de alta especificidad (Morita et al., 2008). El diseño de los cebadores de MAMA-PCR se realiza creando un desajuste o cambio de base (Mismatch) en el penúltimo nucleótido del extremo 3' de la hebra de ADN, mientras que en la última posición del mismo extremo se cambia del nucleótido silvestre al nucleótido mutante (Al-Marzooq, Mohd Yusof, & Tay, 2014)

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar un método de diagnóstico rápido, altamente específico, sensible y económico que permita identificar todas las mutaciones relacionadas con la resistencia a fármacos de primera y segunda línea en muestras clínicas de pacientes infectados con el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos específicos

1. Diseñar cebadores que identifiquen las mutaciones más frecuentes en genes que confieren resistencia a fármacos de primera y segunda línea en los aislados clínicos previamente analizados.
2. Identificar las mutaciones más frecuentes en genes que confieren resistencia a fármacos de primera y segunda línea en los aislados clínicos analizados utilizando la técnica de Mismatch Amplification Mutation Assay (MAMA-PCR).
3. Utilizar los equipos portátiles Mini-PCR® y cámara de electroforesis Bluegel® para identificar mutaciones por medio de la técnica MAMA-PCR.
4. Comparar los resultados de la técnica MAMA-PCR con los métodos de secuenciación Sanger, Genoma Completo y GenoType MTBDRsl.
5. Aplicar el método de MAMA-PCR de identificación de mutaciones en muestras clínicas de pacientes con diagnóstico de tuberculosis.

Metodología

Se analizaron dos grupos de muestras:

Grupo 1: un total de 19 aislados clínicos de *M. tuberculosis* previamente caracterizados genética y fenotípicamente como silvestres y mutantes, los cuales se utilizaron como grupo control.

Grupo 2: un total de 79 Muestras clínicas de esputo de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis de la Clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana (CTHGT).

Todos los pacientes que ingresaron al estudio firmaron el consentimiento informado post explicación de los objetivos y procedimientos del proyecto. A todas las muestras clínicas se les realizó el análisis bacilosκόpico, cultivo microbiológico y pruebas de fármaco sensibilidad (PSF) en las instalaciones del CTHGT, el cual cuenta con instalaciones de Bioseguridad Nivel 3 (BSL3).

Aislados clínicos

Los aislados clínicos utilizados fueron previamente caracterizados molecular y fenotípicamente (García-Ortiz, 2013; Barocio-León, 2016). Un grupo de estas muestras fueron caracterizadas con GenoType MTBDRsl v.1, para confirmar la presencia de mutaciones de segunda línea y por Secuenciación de Genoma Completo.

Muestras clínicas

Las muestras clínicas se obtuvieron de pacientes con sospecha de TB que acudieron a la CTHGT. Se incluyeron muestras tanto positivas como negativas para basiloscopía. De estos dos grupos, se conservó entre 1 – 2 mL de esputo por muestra, para realizar directamente la extracción de ADN, para su posterior análisis molecular. Las muestras positivas a basiloscopía se realizó por duplicado el cultivo Löwenstein-Jensen (L-J), incluyendo la cepa de referencia de *M. tuberculosis H37Rv* como control positivo (García-Ortiz, 2013; Barocio-León, 2016). Las muestras fueron descontaminadas con el método de Petroff, se inocularon por duplicado en el medio L-J a 37 °C, realizando observaciones una vez por semana, durante 8 semanas. Al presentarse crecimiento bacteriano, se tomaron 1-2 colonias

y se guardaron en criotubos de 1.5 mL cerrados herméticamente y fueron transportados bajo condiciones de seguridad y en red de frío al LEEM, donde se realizó el análisis molecular correspondiente (García-Ortiz, 2013; Barocio-León, 2016).

Las muestras clínicas utilizadas correspondieron a pacientes que se encuentran inscritos en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), ingresando al programa de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES).

Técnica de MAMA-PCR para *M. tuberculosis*

Identificación de mutaciones en aislados clínicos

Se seleccionaron aislados clínicos de *M. tuberculosis* previamente identificados (Barocio-León, 2016) que cumplieran con alguna de las siguientes características.

- a. Que presentaran mutaciones no sinónimas en genes asociados a primera línea
- b. Que presentaran mutaciones no sinónimas en genes asociados a segunda línea
- c. Que presentaran mutaciones no sinónimas en genes asociados a primera línea y a segunda línea.

Asimismo, se seleccionaron aislados clínicos que presentaron mutaciones no sinónimas al utilizar la SGC, y aislados clínicos recientemente identificados con resistencia a medicamentos de primera y segunda línea.

Secuenciación de Genoma Completo

En un estudio previamente realizado, se llevó a cabo la SGC en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se prepararon muestras de ADN (10 ng) para la secuenciación con el kit Nextera XT DNA Library Prep, (Illumina) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las bibliotecas genómicas se normalizaron y se ejecutaron en un secuenciador Illumina MiSeq, generando 2 x 250 pb con el método Paired-End. La identificación de mutaciones se realizó utilizando la plataforma PhyResSe (<http://phyresse.org>) basándose en la metodología de los autores (Feuerriegel et al., 2015), seleccionando así, los aislados clínicos que se utilizaron en este estudio.

Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores de MAMA-PCR se realizó considerando las mutaciones de mayor frecuencia que confieren resistencia a fármacos de primera y segunda línea en los aislados clínicos seleccionados (Tabla 1). El diseño se realizó con el programa bioinformático *Geneious v.11*, siguiendo el fundamento de la técnica establecida por Morita et al, (2008). Cada par de cebadores incluye un cebador sentido conservado (5'- 3') y un cebador anti-sentido (3' - 5'), este cebador presenta una alteración en la penúltima posición de la cadena 3' y en la última posición del mismo extremo llevará la mutación que confiere resistencia al fármaco, de esta manera, los cebadores diseñados presentarán una mayor especificidad en el alelo mutan (Morita et al., 2008) (Figura 1).



Figura 1. Diseño de cebadores para el gen katG (INH) en *M. tuberculosis*. El primer nucleótido del extremo 3' es donde se presenta la mutación, el segundo nucleótido es el "Mismatch" o desajuste.

Tabla 1. Mutaciones que confieren resistencia a fármacos utilizados en el tratamiento antituberculosis de primera y segunda línea.

Fármacos	Gen	Codón	Posición del nucleótido	Mutación
Primera línea	<i>rpoB</i>	D516Y	1303	G>T
		H526T	1333	C>T
		H526D	1333	C>G
		S531L	1349	C>T
	<i>inhA</i>	S94A	280	T>G
	<i>katG</i>	S315T	944	G>C
	<i>embB</i>	M306I	918	G>A
		Q497R	1490	A>G
	<i>pncA</i>	A102T	304	G>A
		G105V	314	G>T
V180G		539	T>G	
Segunda línea	<i>gyrA</i>	S91P	271	T>C
		D94N	280	G>A
		D94H	280	G>C
		*S95T	284	G>C
	<i>gyrB</i>	D472N	1414	G>A
		G510K	1530	C>A
	<i>eis</i>	P114S	340	C>T
	<i>rpsL</i>	K43R	128	A>G

*Mutación que confiere susceptibilidad al medicamento (Takiff et al., 1994).

Mutaciones más frecuentes de *M. tuberculosis* obtenidas de :<http://www.tbdreamdb.com/index.html>

Estandarización de cebadores

Los cebadores diseñados se estandarizaron con ADN de los aislados clínicos previamente caracterizados. Se incluyeron muestras sin mutación (alelo silvestre) y otras con la mutación (alelo mutante) correspondiente al gen analizado. La mezcla de PCR se llevó a un volumen final de 10 μ L que contenía ~20 ng de ADN, 1 x de Buffer Accustart II, 1 mM dNTP's, 1.5 mM MgCl₂ Accustart II, 1 mM de cada cebador, 5% de DMSO y 0.15 U Taq Polimerasa Accustart II. Se utilizó el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, CA, USA).

Los amplicones fueron observados en gel de agarosa al 2% (p/v), se corrieron en buffer 1 X TBE a 80V 35 min y fueron teñidos con 24 X de Gelstar (Cambrex®). Para la identificación del tamaño del fragmento amplificado se utilizó una regla molecular Invitrogen (100 pb). Una vez estandarizados los cebadores en el equipo tradicional, se procedió a estandarizarlos en equipo portátil, termociclador Mini-PCR (mini-PCR Thermal Cycler 2013-2017 Amplyus) y cámara de electroforesis BlueGel (2013-2017 Amplyus).

Determinación del perfil de farmacorresistencia con GenoType MTBDRsl

El uso del kit GenoType MTBDRsl para la determinación de farmacorresistencia fue realizado siguiendo las indicaciones del proveedor. Se realizó una PCR con una mezcla de 45 µL que incluía 35 µL de la mezcla de primer/nucleótido (PNM) (suministrado por el proveedor), 10 x buffer Accustart II, 25 mM MgCl₂ y 0.2 U/ µL de Taq DNA polimerasa Accustart II. El perfil de temperatura utilizado es el recomendado por el proveedor, modificando únicamente la temperatura de extensión a 72 °C (Tabla 2). La hibridación en las tiras reactivas se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

Tabla 2. Perfil del termociclador para PCR de GenoType MTBDRsl v.1

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	5 min	1X
95 °C	30 s	10X
58 °C	2 min	
95 °C	25 s	
53 °C	40 s	20X
72 °C	40 s	
72 °C	8 min	1X

Extracción de ADN de *M. tuberculosis* de muestras clínicas

Se utilizó de 1 – 2 mL de esputo por cada muestra clínica seleccionada. La muestra se colocó en un tubo de 2 mL con tapón de rosca con 100 µL de solución de lisis (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA y 1 % Tritón X-100). Los tubos se calentaron a 94 °C durante 20 min en un termoblock, posteriormente se centrifugaron por 30 s a 6000 rpm en una microcentrifuga. Las muestras fueron separadas cada una en dos tubos nuevos (600 µL aproximadamente en cada tubo), se agregaron 100 µL de 10 % tritón X-100, 10 µL de 10 ng/mL lisozima. Los tubos fueron incubados a 37 °C por una hora en un termobloque con agitación cada 30 min, después los tubos fueron centrifugados a 6000 rpm por 30 s en microcentrifuga. Se agregaron 250 µL de buffer de proteínasa K (10 mM Tris-HCl, 50 mM, EDTA, 5 % SDS, pH= 7.8) y 10 µL de 20 ng/mL solución proteínasa K a cada tubo. Los tubos fueron incubados por 8 horas a 56 °C en agitación constante. Posterior a la incubación, se agregaron 350 µL de 24:1 cloroformo alcohol-isoamílico a cada tubo y se agitó en vortex a máxima velocidad por 5 min y se centrifugó nuevamente a 6000 rpm por 15 minutos tres veces. Se transfirió inmediatamente el sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrifuga y se agregó 70 % del volumen con isopropanol frío, se mezcló suavemente por inmersión. Los tubos se dejaron en precipitación a -20 °C durante 12 horas. Después de la precipitación, las muestras fueron centrifugadas 15 min a 13000 rpm, después se agregaron 500 µL de etanol al 70 %, se agitaron suavemente cada 5 min por 20 min. Los tubos fueron centrifugados a 13000 rpm durante 15 min, el sobrenadante fue desechado con cuidado de no verter el pellet, el cual fue deshidratado al vacío a 35 °C durante 15 min y finalmente el pellet fue disuelto en 30 µL de Buffer TE y se mantuvo por 20 min a 35 °C. Fue almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

Identificación molecular de la especie

La identificación de especie de *M. bovis* y *M. tuberculosis* se realizó en una PCR multiplex la cual amplifica una región del operón *mce-3*, siguiendo las indicaciones del autor (Bakshi et al., 2005), con algunas modificaciones (García-Ortiz, 2013). La amplificación del fragmento 337 pb corresponde a *M. tuberculosis* y 168 pb a *M. bovis*.

Amplificación por MAMA-PCR en muestras clínicas

Se realizó la amplificación de una región de *rpoB* para determinar la calidad de ADN de las muestras clínicas de pacientes que se encuentran en la plataforma SINAVE. Los cebadores diseñados se probaron con ADN obtenido directamente de las muestras clínicas. Se agregó un control positivo (aislado clínico mutante) correspondiente a cada uno de los genes analizados (*katG*, *rpoB*, *embB* y *eis*), además de agregar un control negativo (agua nanopura). Las condiciones de reacción (Tabla 4) y el perfil de termociclador (Tabla 5) son de acuerdo con cada gen estandarizado con los aislados clínicos.

Resultados

Estandarización de los cebadores MAMA-PCR en equipo tradicional, aplicado en aislados clínicos

Se diseñaron veinte pares de cebadores MAMA-PCR para *M. tuberculosis* (Tabla 3), de los cuales solo se logró estandarizar el 35% (7 pares), los cuales corresponden a cada uno de los genes analizados. Todos los genes se lograron amplificar con las mismas condiciones de reacción de PCR, con excepción del gen *rpoB*, en donde se aumentó a 2 mM de MgCl₂ y no se añadió DMSO (Tabla 4). El perfil de temperatura fue el mismo para todos los pares de cebadores, con excepción de la temperatura de hibridación (Tabla 5).

El tiempo de electroforesis empleado para visualizar los amplicones varió de acuerdo con los genes amplificados, en *embB* y *eis* fue de 30 min, para *rpoB*, *katG*, *rpsL* y *gyrA* fue de 35 min, y únicamente el tiempo para *pncA* fue de 40 min. El voltaje aplicado fue de 80 V para todos los genes (Tabla 6). Las mutaciones previamente definidas para cada muestra del Grupo 1 utilizadas en la estandarización de cada gen se indican en la Tabla 7, determinando así, los controles silvestres y mutantes.

Los cebadores estandarizados presentaron una sensibilidad de 100%, ya que los pares de cebadores MAMA-PCR detectaron las muestras mutantes correspondientes a cada una de los genes y regiones analizadas con secuenciación Sanger, Secuenciación de Genoma Completo y GenoType MTBDRsl, logrando discriminar las muestras previamente definidas como silvestres.

Tabla 3. Diseño de 20 pares cebadores MAMA-PCR para *M. tuberculosis*, para fármacos de primera y segunda línea del tratamiento antituberculosis.

Gen	Codón	Posición del nucleótido	Mutación	Cebador sentido (5'-3')	Cebador Mutante antisentido (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>Fármacos de primera línea</i>						
<i>rpoB</i>	S531L	1349	C>T	CCGCTTGCACGAGGGTCA	CGCCGGGCCCCAGCGCTA	347
					ACCGCCGGGCCCCAGCGCTA	349
	D516Y	1303	G>T		CAGCGGGTTGTTCTGGGA	320
	H526D	1333	C>G	GCCACCATCGAATATCTGGTCC	GACAGTCGGCGCTTGCC	349
	*H526T	1333	C>T		GACAGTCGGCGCTTGCA	349
<i>inhA</i>	S94A	280	T>G	ATGACAGGACTGCTGGACG	TGCGGCATGAACCCAATCTC	299
<i>katG</i>	S315T	944	G>C	GCAGATGGGGCTGATCTACGT	CCATACGACCTCGATGCCAG	295
<i>embB</i>	M306I	918	G>A	TGAAACTGCTGGCGATCATC	TGGTCGGCGACTCGGGAT	285
	Q497R	1490	A>G	TACAACCTGCTGGCGCTGATG	GCACCAGGCTGTCGTAGATCTC	490
<i>pncA</i>	A102T	304	G>A	TCAGGAGCTGCAAACCAACTC	ACTTCCATCCCAGTCTGGCT	323
	G105V	314	G>T		CGGCGGGACTTCCATAA	331
	V180G	539	T>G	TGTACGCTCCGGTGTAGGCA	TCCAACACCGTTGACAGGGTAC	287
<i>Fármacos de segunda línea</i>						
<i>gyrA</i>	S91P	271	T>C		GCACCAGGCTGTCGTAGATCTG	271
	D94N	280	G>A	ATGACAGACACGACGTTGCC	CATGCGCACCAGGCTGCT	297
	D94H	280	G>C		CATGCGCACCAGGCTGCG	297
	S95T	284	G>C		TGGGCCATGCGCACCAGTG	302
<i>gyrB</i>	D472N	1414	G>A	GACCGCAAGCTACTGAAGGAC	TATCGCCTGGAACATCGAAGT	434
	G510K	1530	C>A	TGAACAAGGCTGTGTCCTCG	ACTCGTCGTGGATCCCGGCT	329
<i>eis</i>	P114S	340	C>T	GTGACTGTGACCCTGTGTAGC	CATGCAGTGCCGCGACCTA	358
<i>rpsL</i>	K43R	128	A>G	ATGCCAACCATCCAGCAGCT	AAGCGCCGAGTTCGGCTTAC	147

**rpoB* H526T en aislados mutantes amplifica dos bandas, una de ~349 y una de ~500 pb.

Tabla 4. Concentraciones de reactivos utilizados en la reacción de MAMA-PCR.

Reactivos	Concentración
nH ₂ O	nanopura
Buffer Accustart II	1 X
dNTPs	1 mM
*MgCl ₂	1.5 mM
Cebador sentido	1 mM
Cebador antisentido	
**DMSO	5%
Taq polimerasa Accustart II	5 U/μL
ADN genómico	~20ng/μL
Total Rx	10 μL

*MgCl₂: en *rpoB* se aumentó a 2 mM.

**DMSO: en *rpoB* no se añade.

Tabla 5. Modificaciones en la temperatura de hibridación en termociclador tradicional C1000 Touch Thermal Cycler.

Perfil del termociclador en C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad)		
Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	5 min	1x
95	1 min	
*62-69	1min	35x
72	1 min	
72	10 min	1x

***Temperatura de hibridación (°C)**

rpoB = 67.0 *gyrA* = 68.0
katG = 68.0 *rpsL* = 64.5
embB = 69.0 *eis* = 62.0
pncA = 62.0

Tabla 6. Tiempo de electroforesis para la visualización de los amplicones obtenidos en el termociclador C1000 Touch Thermal Cyclers.

Fármacos	Gen	Tiempo (min)
Primera línea	<i>rpoB</i>	35
	<i>katG</i>	35
	<i>embB</i>	30
	<i>pncA</i>	40
Segunda línea	<i>rpsL</i>	35
	<i>gyrA</i>	35
	<i>eis</i>	30

Tabla 7. Grupo 1: Aislados clínicos definidos como silvestres y mutantes que han sido utilizados en la estandarización de los cebadores MAMA-PCR.

Muestra	Identificación molecular	Mutación						
		<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>embB</i>	<i>pncA</i>	<i>gyrA</i>	<i>rpsL</i>	<i>eis</i>
C334	A	SM						
C616	A	SM						
C346	A	H526T						
C352	A	H526T						
C575	A	H526T						
C652	A	H526T						
C459	A	H526T						
C505	A	H526T						
C211	A		S315T					
C297	A		S315T					
C086	A, B				V180G			
C035	A		SM					
C269	A		SM	SM	SM	SM	SM	SM
C274	A		SM	SM	SM	SM	SM	SM
C073	A	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
C223	A							P114S
C053	A, B, C					S91P		
C052	A, B			Q497R				
C557	A						K43R	

A= Secuenciación Sanger
 B= Secuenciación de Genoma Completo
 C= GenoType MTBDRsl v.1
 SM= Sin Mutación

Genes asociados a fármacos de primera línea

En el gen *rpoB* la visualización de los amplicones presentó discriminación entre los aislados definidos previamente como mutantes y silvestres. Se obtuvo la amplificación de dos bandas para las muestras mutantes, una de ~349 pb y otra de ~500 pb, mientras que para la muestra silvestre se obtuvo una única banda de ~349 pb (Figura 2). En el gen *katG*, la muestra mutante amplificó una única banda mientras que la muestra silvestre no presentó ningún bandeo (Figura 3-A). En el gen *pncA* solo se observó una banda en la muestra mutante y en la muestra silvestre no tuvo amplificación (Figura 3-B). En el gen *embB*, se observó una banda en la muestra mutante, mientras que las muestras silvestres no tuvieron amplificación (Figura 3-C).

Genes asociados a fármacos de segunda línea

En el gen *gyrA*, se observó una banda para la cepa mutante, mientras que las muestras silvestres no tuvieron amplicones (Figura 3-D). En el gen *rpsL*, la visualización de los amplicones permitió observar la discriminación entre las muestras silvestres y mutante, dado como resultado una banda correspondiente a la muestra mutante, mientras que las muestras silvestres no fueron amplificadas (Figura 3-E). Por último, en el gen *eis*, solamente se observa amplificación en la muestra mutante (Figura 3-F).

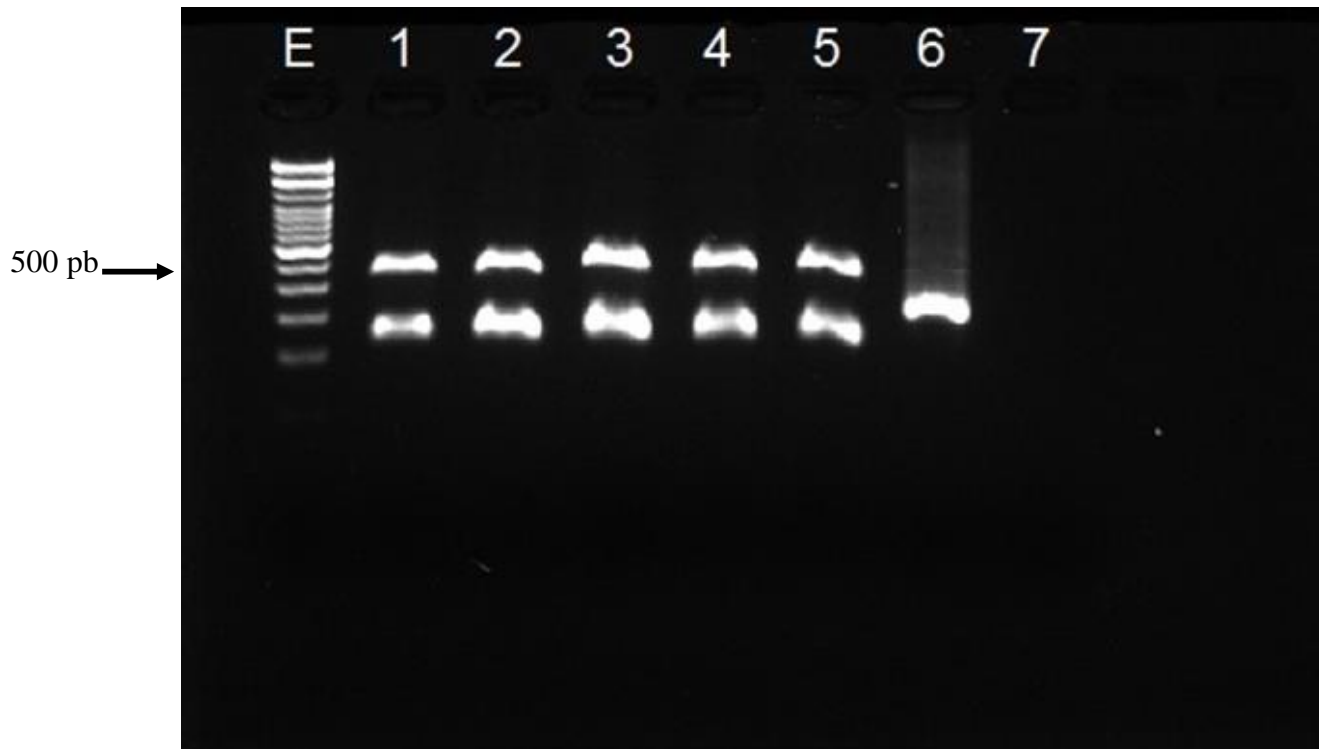


Figura 2. Amplicones por MAMA-PCR del gen *rpoB*, mutación *H526T* de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 2% (p/v). Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) C346-TB, (2) C352-TB, (3) C575-TB, (4) C505-TB (Positivo mutante), (5) C505-A-TB (mutante) (6) C334-TB (Positivo silvestre), (7) Negativo. (agua nanopura).

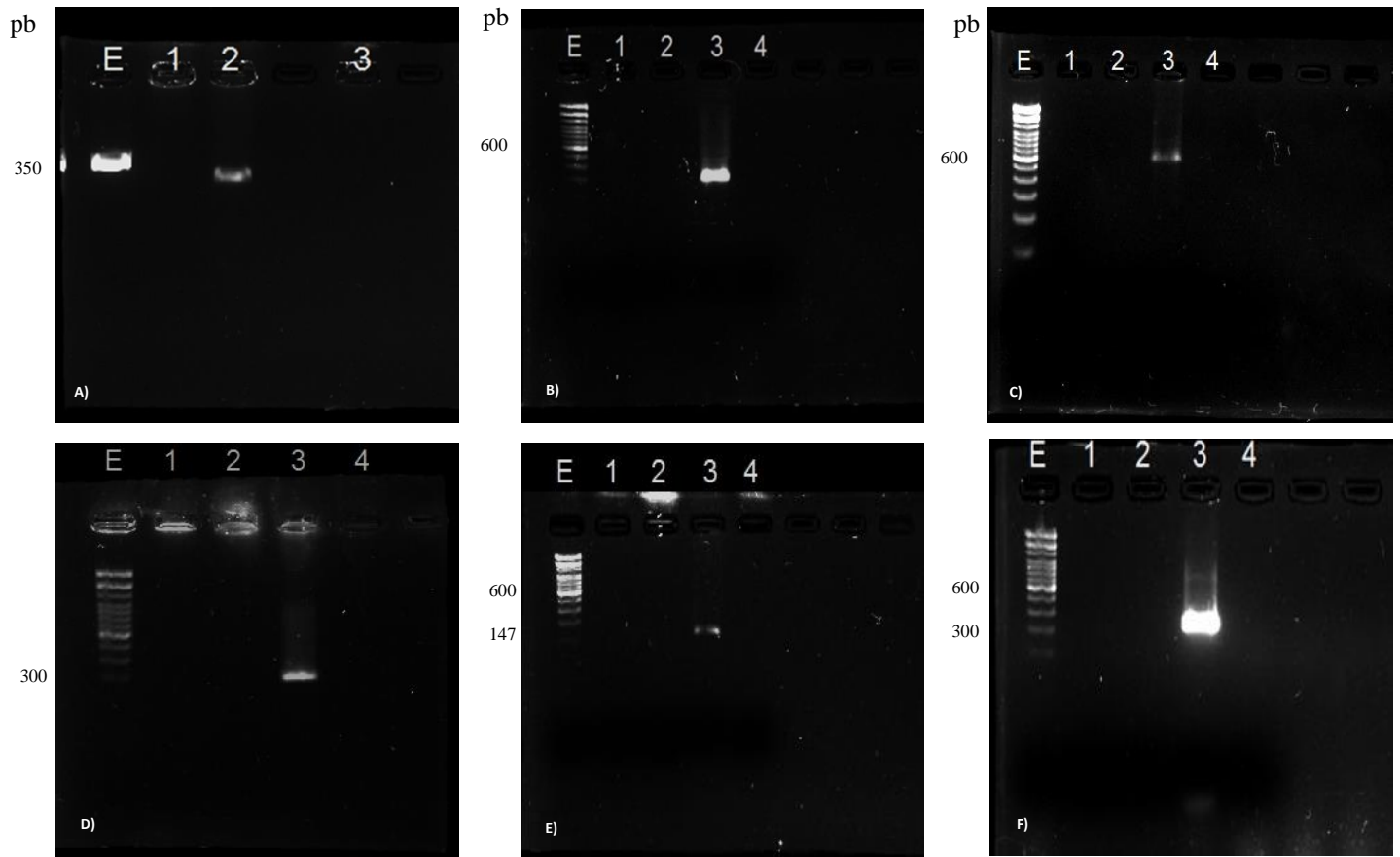


Figura 3. Amplicones por MAMA-PCR de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 2% (p/v) **A)** *katG*, mutación *S315T* de Líneas: (E) Escalera molecular (350 pb); Muestras: (1) C274, (2) C297 y (3) Negativo. **B)** *pncA*, mutación *V180G*. Líneas: (E) Escalera molecular (500 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C086 (Mutante) y (4) Negativo. **C)** *embB*, mutación *Q497R* Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C052 (Positivo mutante) y (4) Negativo. **D)** *gyrA*, mutación *S91P*. Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C053 (Mutante) y (4) Negativo. **E)** *rpsL*, mutación *K43R*. Líneas: (E) Escalera molecular (100 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C557-TB (Mutante) y (4) Negativo. **F)** *eis*, mutación *P114S*. Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (400 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C223 (Mutante) y (4) Negativo.

Estandarización de los cebadores MAMA-PCR en equipos portátiles

Se aplicó la técnica de MAMA-PCR con los cebadores previamente estandarizados en los equipos portátiles Mini-PCR® y cámara de electroforesis Bluegel®. La reacción de PCR fue realizada con las mismas concentraciones de reactivos que en el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Tabla 4), y solo se realizaron modificaciones en la temperatura de hibridación en cada uno de los genes (Tabla 8) y en los tiempos de electroforesis (Tabla 9). Se logró amplificar muestras mutantes con seis de los siete pares de cebadores previamente estandarizados, tres pares de cebadores de genes de primera línea y tres de genes de segunda línea.

En el gen *rpoB*, se logró observar dos bandas pertenecientes a los aislados mutantes, mientras que los aislados silvestres solo presentan una banda (Figura 4-A). En el gen *katG*, se observó una única banda que pertenece a los aislados mutantes, mientras que los aislados silvestres presentan una banda tenue y poco definida (Figura 4-B). En el gen *embB* se observó en los aislados silvestres una banda de mayor peso, esto se identificó por el uso de una escalera molecular de 650 pb, mientras que el aislado mutante presenta la banda de menor tamaño, por lo que se amplificó la región mutante (Figura 4-C).

En el gen *gyrA*, se realizó un aumento de temperatura permitió la amplificación de la muestra mutante, mientras que las muestras silvestres no amplificaron (Figura 4-D). En el gen *rpsL*, se presentó banda en las muestras silvestres y mutante, pero debido al uso de una regla molecular de 300 pb, se descartó que las muestras silvestres amplifiquen la región mutante, en cambio la banda que se presenta en la muestra mutante es de menor tamaño, tratándose del fragmento de interés (Figura 5-A). Finalmente, en el gen *eis*, se observaron dos bandas en las muestras silvestres, mientras que en la muestra mutante solo se presenta una banda (Figura 5-B).

Tabla 8. Modificaciones en el perfil del termociclador en Mini-PCR.

Perfil del termociclador en Mini-PCR		
Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	5 min	1x
95	1 min	
*65-69.5	**1 min	35x
72	***1 min	
72	10 min	1x

***Temperatura de hibridación (°C)**

rpoB = 68.5 *gyrA* = 69.5

katG = 69.5 *rpsL* = 68.0

embB = 69.0 *eis* = 65.0

****Tiempo de hibridación**

embB = 40 s

eis = 40 s

***** Tiempo de extensión**

embB = 50 s

eis = 50 s

Tabla 9. Tiempo de electroforesis correspondiente a cada gen en Bluegel ®.

Fármacos	Gen	Tiempo (min)
Primera línea	<i>katG</i>	40
	<i>embB</i>	45
	<i>rpoB</i>	40
Segunda línea	<i>rpsL</i>	35
	<i>gyrA</i>	30
	<i>eis</i>	35

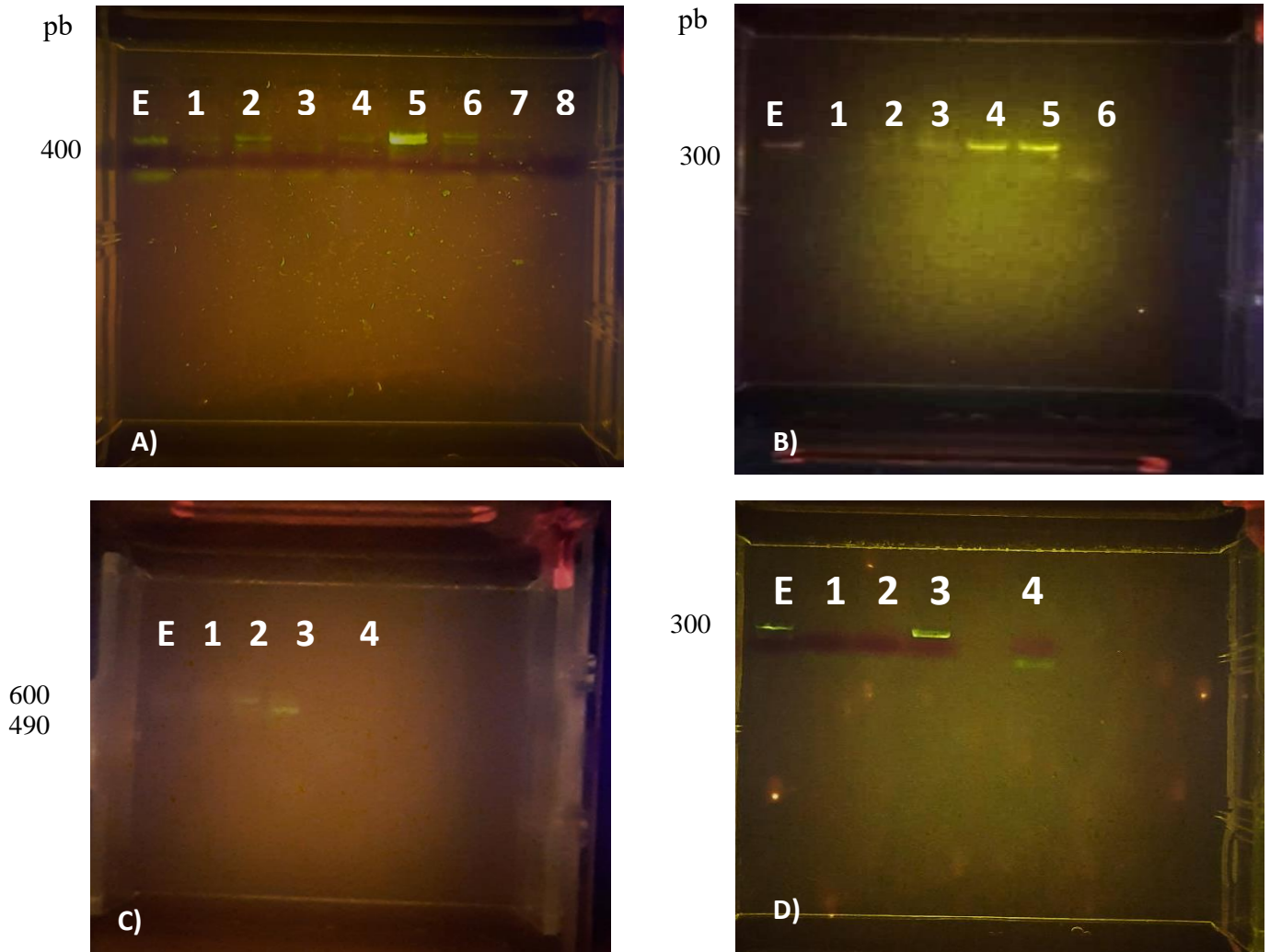


Figura 4. Amplicones de MAMA-PCR de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 1% (p/v).

A) *rpoB*, Líneas: (E) Escalera molecular (400 pb); Muestras: (1) C346-TB, (2) C352-TB, (3) C575-TB, (4) C334-TB (Silvestre), (5) C505-TB (Positivo), (6) C575-TB, (7) C616-TB (Silvestre) y (8) Negativo. **B) *katG***, Líneas: (E) Escalera molecular (300 pb); Muestras: (1) C274, (2) C035, (3) C269, (4) C211, (5) C297 y (6) Negativo. **C) *embB***, Líneas: (E) Escalera molecular (650 pb); Muestras: (1) C274, (2) C269, (3) C052 y (4) Negativo. **D) *gyrA***, Líneas: (E) Escalera molecular (300 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C053 y (4) Negativo.

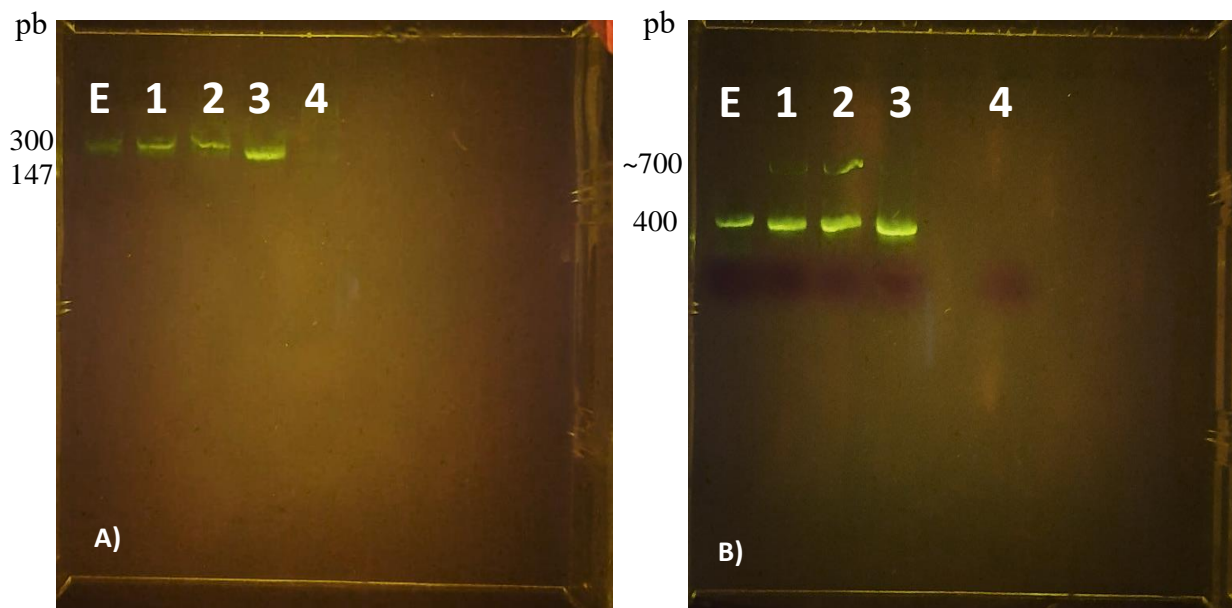


Figura 5. Amplicones de MAMA-PCR de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 1% (p/v). **A)** *rpsL*, Líneas: (E) Escalera molecular (300 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C557 y (4) Negativo. **B)** *eis*, Líneas: (E) Escalera molecular (400 pb); Muestras: (1) C269, (2) C274, (3) C223 y (4) Negativo.

Determinación del perfil de farmacorresistencia Genotípico/GenoType MTBDRsl

Se utilizaron ocho muestras clínicas del grupo 2 procedentes de la CTHGT, las cuales no presentaron farmacorresistencia a FQ, aminoglucósidos ni EMB (Figura 6). Además, se realizó la prueba en dos aislados clínicos: C053; que presenta una mutación en el codón S91P, esta mutación también que fue obtenida por medio de SGC y Secuenciación Sanger y en la muestra C075 como control silvestre. En la C053 se presentó un bandeo colorimétrico en el gen *gyrA*; y revisando el manual de usuario se determinó que el bandeo pertenece a la MUT2 (S91P) (Figura 7).

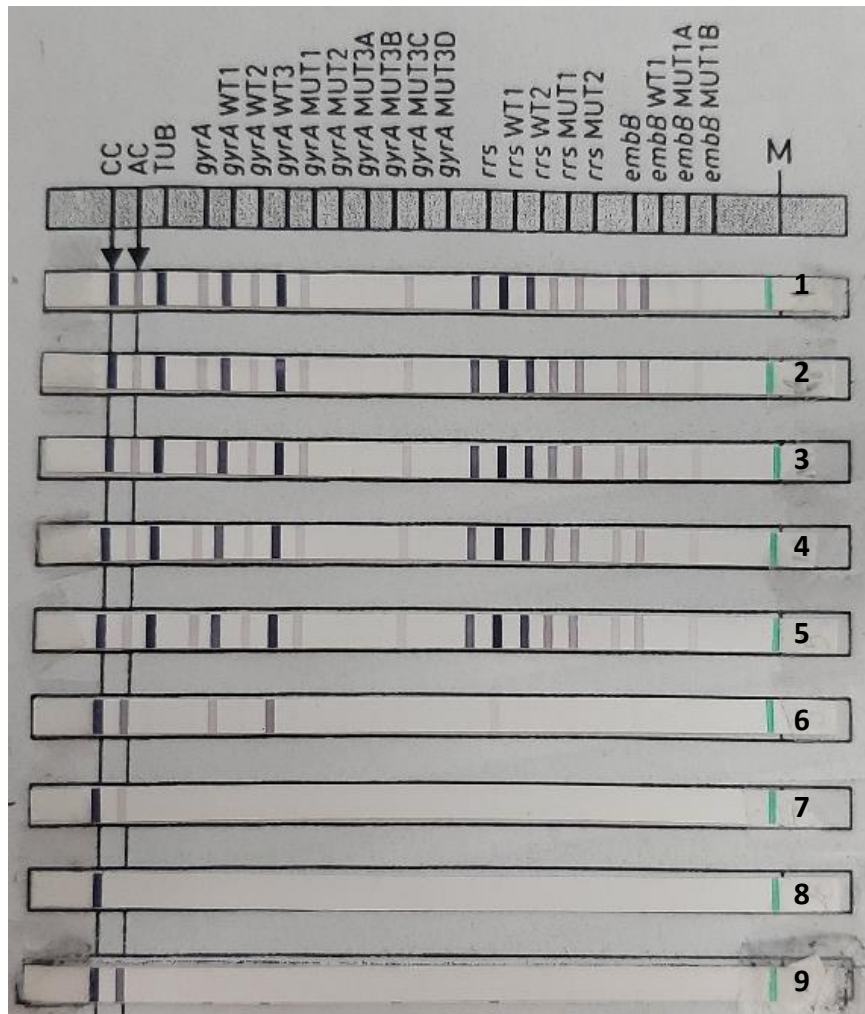


Figura 6. Tiras reactivas del kit GenoType MTBDRsl v.1 Muestras clínicas: (1) 042/18, (2) 1251/18, (3) 1310/18, (4) 1421/18, (5) 1635/18, (6) OMB Mix 3 (9, 10, 11), (7) OMB Mix GenoLyse (9, 10, 11) (8) OMB mix casero (9, 10, 11) y (9) Negativo.

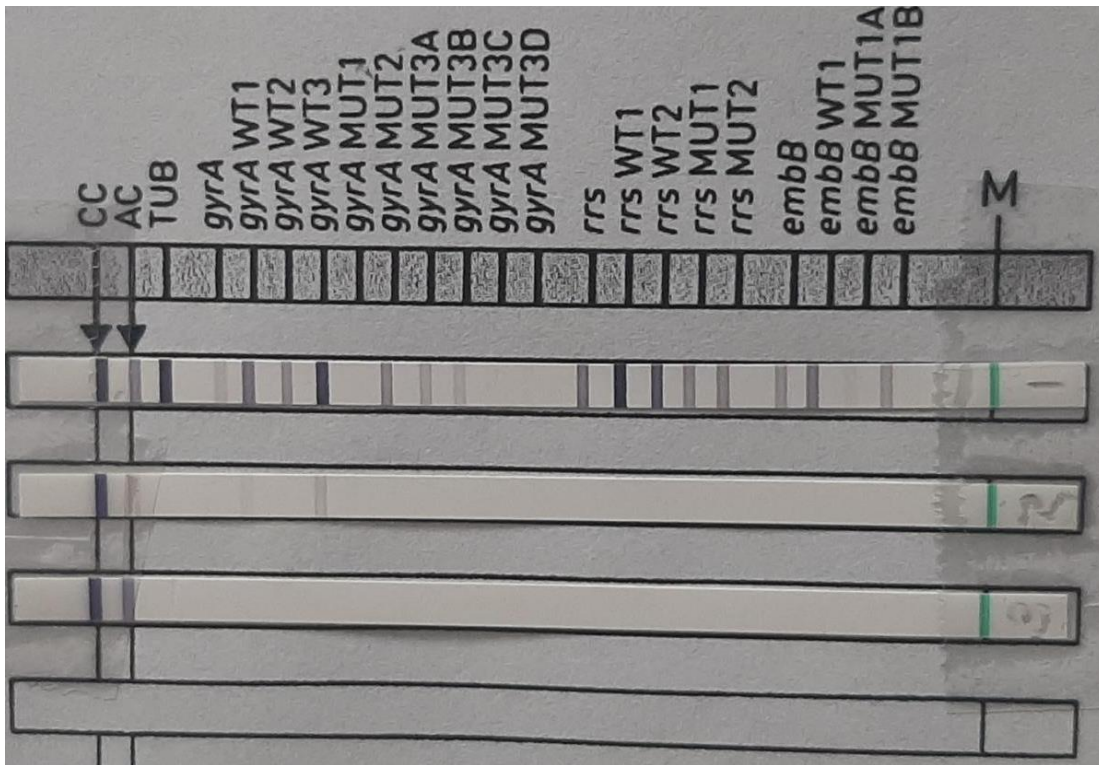


Figura 7. Tiras reactivas del kit GenoType MTBDRsl v.1 con muestras del Grupo 1: (1) C053, (2) C075, (3) Negativo.

Aplicación de la técnica MAMA-PCR en muestras clínicas de pacientes con TB pulmonar

Se realizó la extracción de ADN de 20 muestras del Grupo 2 (Figura 8) y se realizó mPCR de 31 muestras procedentes del mismo grupo (Figura 9-10), además se analizó el ADN de 28 muestras pertenecientes a este grupo que son de pacientes diagnosticados con TB y registrados en la plataforma SINAVE entre el año 2012 al 2019. El perfil fenotípico previamente analizado, indica que todas las muestras son farmacosensibles.

Para verificar la calidad del ADN de las muestras entre el año 2012-2019, se realizó previamente una amplificación de la región control de *rpoB* (Bhattacharya et al., 2003) (Figura 11). Las muestras clínicas se amplificaron con los cebadores para identificar mutaciones en genes *rpoB*, *katG*, *embB* y *eis*, tanto con equipo tradicional como equipo portátil. Las muestras clínicas con los cebadores MAMA-PCR se aplicaron para *rpoB* donde amplificaron una banda, en cambio en el resto de los genes no se obtuvo ninguna banda. Estos resultados de la amplificación indican que las muestras son silvestres (Figura 12-13), lo que corresponde al perfil fenotípico previamente consultado en la plataforma SINAVE.

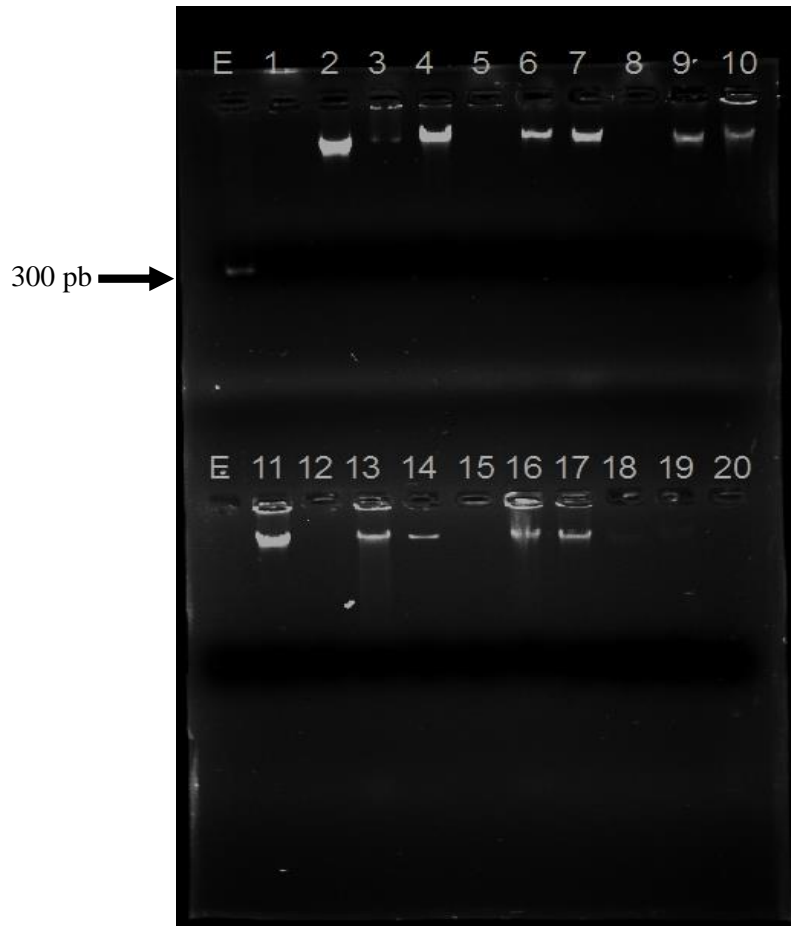


Figura 8. Extracción de ADN de las muestras clínicas de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 1% (p/v). E: Escalera molecular 300 pb Líneas: (E) Escalera molecular (300 pb); Muestras clínicas: (1) 1526/19, (2) 1357/19, (3) 1358/19, (4) 1378/19, (5) 1391/19, (6) 1422/19, (7) 1439/19, (8) 1494/19, (9) 1393/19, (10) 1404/19, (11) 1409/19, (12) 1302/19, (13) 1303/19, (14) 1313/19, (15) 1329/19, (16) 1331/19, (17) 1332/19, (18) 1344/19, (19) 1346/19 y (20) 1338/19.

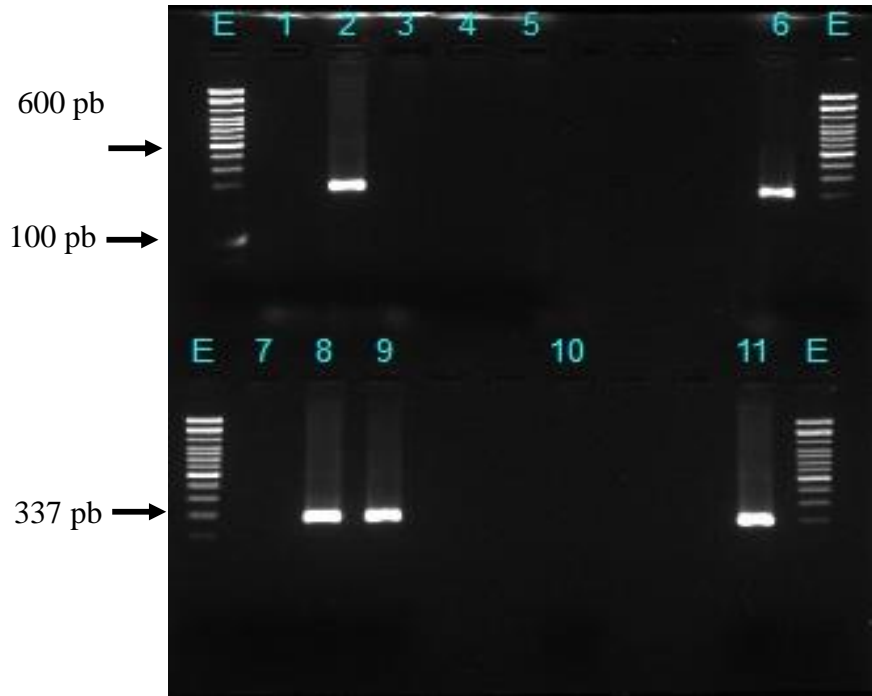


Figura 9. Amplicones de mPCR (diferenciación de especie causante de TB) de muestras clínicas de tuberculosis. Gel de agarosa 2% (p/v). E: Escalera molecular Invitrogen (100 pb). Líneas: (1) 1144/19, (2) 1248/13, (3) 1222/19, (4) 1219/19, (5) 1050/19, (6) Positivo para *M. tuberculosis* (1088/19), (7) 1212/19, (8) 1075/19, (9) 1138/19, (10) Negativo (agua nanopura), (11) Positivo para *M. tuberculosis* (316/19).

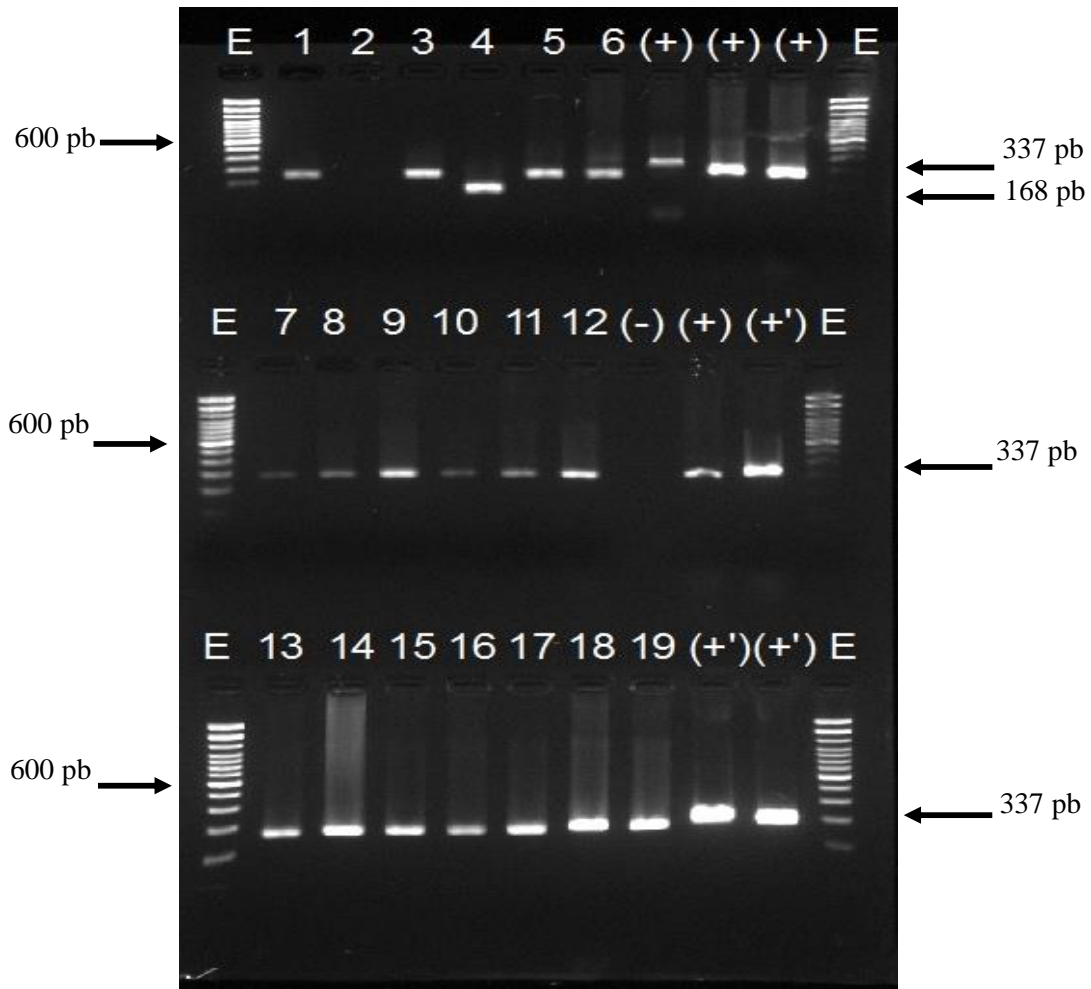


Figura 10. Amplicones de mPCR (diferenciación de especie) de muestras clínicas de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa 2% (p/v). E: Escalera molecular Invitrogen (100 pb). Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras clínicas: (1) 1168/19, (2) 1050/19, (3) 1221/19, (4) 1212/19, (5) 1159/19, (6) 1075/19, (7) 1138/19, (8) 1187/19, (9) 1086/19, (10) 1164/19, (11) 1302/19, (12) 985/19, (13) 1051/19, (14) 1098/19, (15) 1190/19, (16) 982/19, (17) 1049/19, (18) 1273/19 y (19) 1099/19. Positivos para *M. tuberculosis* (+) 1088/19, (+') 308/19 y (-) Negativo (agua nanopura).

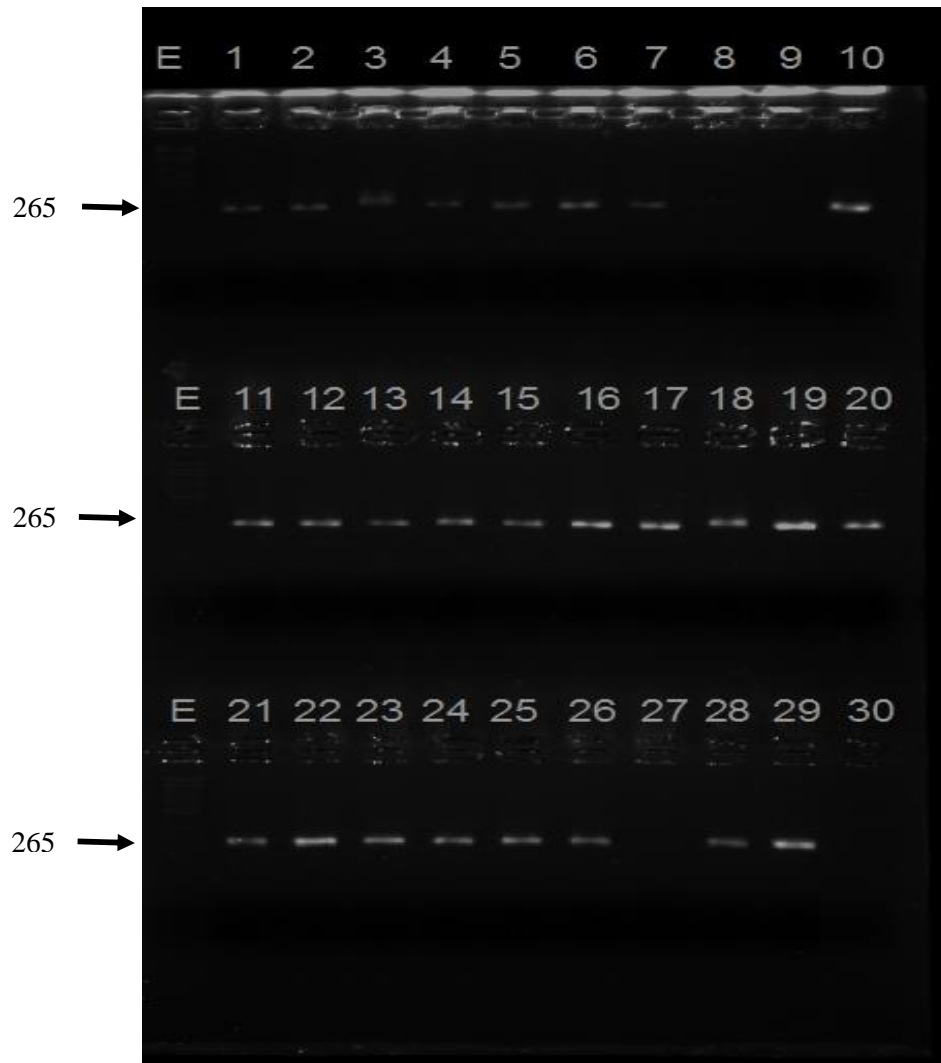


Figura 11. Amplicones de la región control de *rpoB*, de muestras clínicas incluidas en la plataforma SINAVE Gel de agarosa 2% (p/v). Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) MyMc546, (6) MyMc569, (7) MyMc583, (8) MyMc585, (9) MyMc592, (10) MyMc597, (11) MyMc604, (12) MyMc608, (13) MyMc610, (14) MyMc614, (15) MyMc624, (16) MyMc645, (17) MyMc649, (18) MyMc652E, (19) MyMc692, (20) MyMc700, (21) MyMc702, (23) MyMc704, (24) MyMc705, (25) MyMc706 (26) MyMc707, (27) MyMc723, (28) MyMc740, (29) C334 (Positivo) y (30) Negativo.

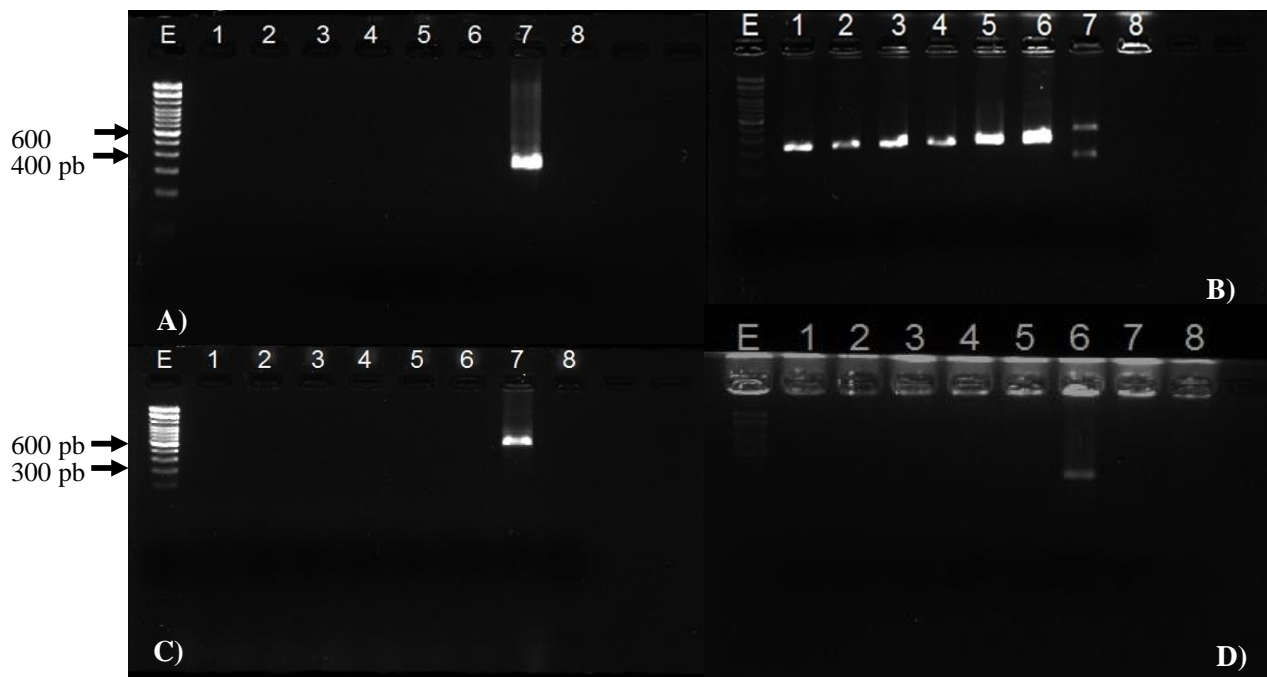


Figura 12. Amplicones del MAMA-PCR aplicado en muestras clínicas de tuberculosis. Gel de agarosa 2% (p/v). **A) *katG***: Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) MyMc546, (6) C274 (positivo silvestre) (7) C211 (positivo Mutante) y (8) Negativo (agua nanopura). **B) *rpoB***: Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) MyMc546, (6) C274 (positivo silvestre) (7) C505-TB (Positivo Mutante) y (8) Negativo (agua nanopura). **C) *embB***: Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) MyMc546, (6) C274 (positivo silvestre) (7) C052 (Positivo Mutante) y (8) Negativo (agua nanopura). **D) *eis***: Líneas: (E) Escalera molecular Invitrogen (100 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) MyMc546, (6) C223 (Positivo Mutante) (7) C616-TB (positivo Silvestre) y (8) Negativo (agua nanopura).

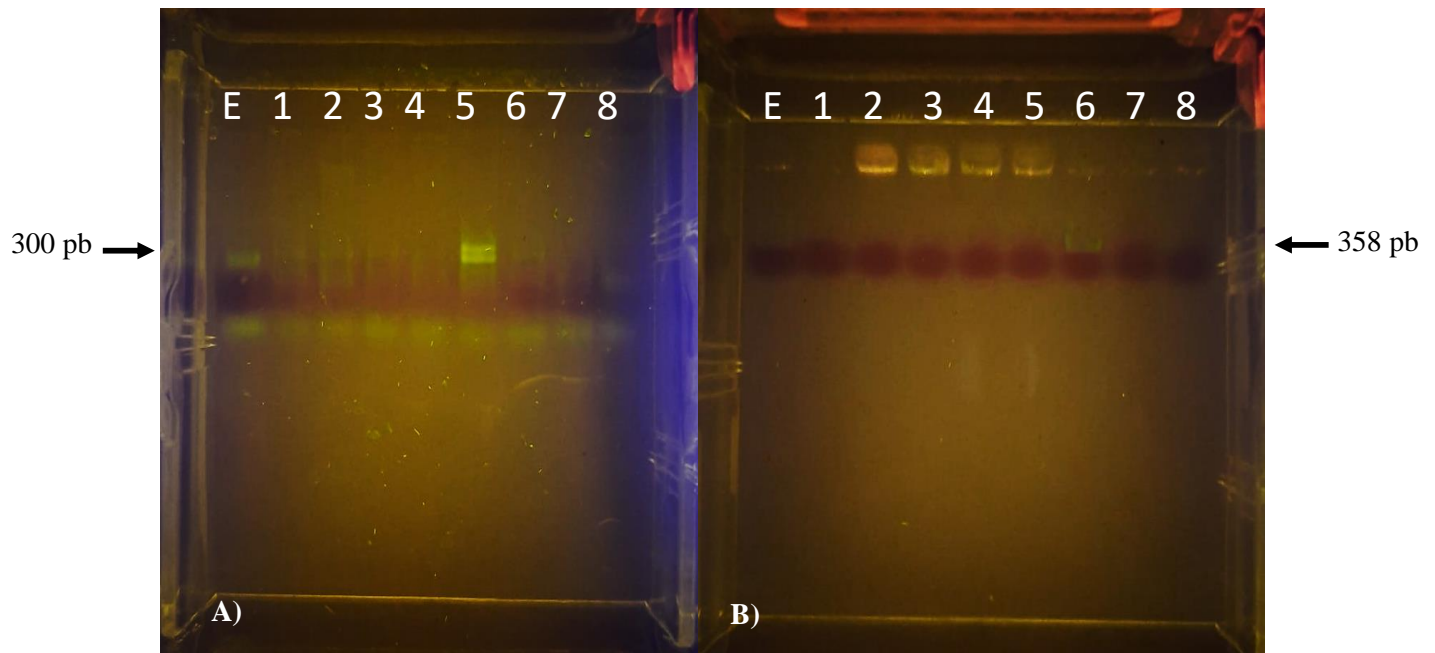


Figura 13. Amplicones del gen *rpoB* y *eis* de muestras clínicas incluidas en la plataforma SINAVE. Gel de agarosa 1% (p/v) **A) *rpoB***: Líneas: (E) Escalera molecular (300 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) C505-TB (positivo Mutante), (6) C9334-TB (Silvestre), (7) C616-TB (Silvestre) y (8) Negativo. **B) *eis***: Líneas: (E) Escalera molecular (300 pb); Muestras: (1) MyMc485, (2) MyMc486, (3) MyMc520, (4) MyMc531, (5) C334-TB (silvestre), (6) C223 (positivo mutante), (7) C616-TB (positivo Silvestre de *M. tuberculosis*) y (8) Negativo.

Discusión

La técnica MAMA-PCR se desarrolló de forma exitosa en aislados y muestras clínicas de *M. tuberculosis*, permitiendo discriminar entre silvestres y mutantes con respecto a siete genes que confieren resistencia a los fármacos de primera y segunda línea. Esta es la primera vez que se utiliza la técnica MAMA-PCR en aislados y muestras clínicas de *M. tuberculosis*. La técnica MAMA-PCR se había aplicado anteriormente en bacterias como *Vibrio cholera* (Morita et al., 2008), *Escherichia coli* (Qiang et al., 2002), *Mycoplasma bovis* (Sulyok et al., 2018b), *Klebsiella pneumoniae* (Al-Marzooq et al., 2014), *Campylobacter jejuni* (Alonso et al., 2005) entre otras. También se ha utilizado en virus como Hepatitis C (Fonseca-Coronado et al., 2011).

Recientemente se aplicó la técnica Multiplex Allele-Specific PCR (MAS-PCR) en *M. tuberculosis* (Kumari et al., 2018), la cual utiliza una mezcla de cebadores específicos que amplifican e identifican mutaciones en los genes *gyrA* (D94G) y *rrs* (A1401G), que confieren resistencia a ofloxacina y kanamicina, respectivamente (Kumari et al., 2018), sin embargo, esta técnica no detecta resistencia a medicamentos de primera línea.

La técnica de GeneXpert MTB/RIF identifica molecularmente la presencia de *M. tuberculosis* y resistencia a RIF, las principales ventajas es que se utiliza muestra clínica y presenta una especificidad de 99% y una sensibilidad a RIF de 86% (Agrawal, Bajaj, Bhatia, & Dutt, 2016) y los resultados se obtienen en menos de tres horas (Rice et al., 2017), sin embargo, solo identifica las mutaciones de mayor frecuencia a nivel mundial (Wejse & Bissau, 2014), por lo que se han reportado falsos negativos (Zetola et al., 2014) (Rice et al., 2017). Por otro lado, el equipo tiene un costo de USD\$ 17,000-32,000 y cada cartucho un precio de USD\$ 9.98 (Vassall et al., 2011), por lo que representa un reto económico para países en vías de desarrollo (Shagufta, Zeenat, Shahida, Yusuf, & Maleeha, 2015), como México. En 2010 la OMS recomendó el uso de este equipo como método de diagnóstico en países con alta incidencia de TB, además de incluirlo dentro del POC, al ser un ensayo simple de laboratorio (García-Basteiro et al., 2018), que puede diagnosticar TB

pulmonar y TB extrapulmonar directamente de muestras clínicas (Hillemann, Rüscher-Gerdes, Boehme, & Richter, 2011) (Agrawal et al., 2016).

La prueba GenoType MTBDRsl permite la detección de las mutaciones más frecuentes a nivel mundial (Tho et al., 2008), que confieren resistencia a fármacos de segunda línea de tratamiento antituberculosis y tiene una sensibilidad de 98.1% a partir de cultivos en medio sólido o líquido (Gao et al., 2018). El uso de estos ensayos tipo LiPA, requieren una mayor inversión económica (Solari et al., 2011), por su elevado costo debido a que se utiliza tecnología de ADN-strip y membranas de nitrocelulosa (Caulfield & Wengenack, 2016), además, al ser un ensayo rápido que se realiza en un mismo recipiente, existe la probabilidad de contaminación cruzada (cross contamination).

El kit GenoType MTBDRsl v.1 incluye una sonda de hibridación para detectar la mutación Ser91Pro en el gen *gyrA*, esta mutación se ha identificado en un 11.5% en aislados clínicos pertenecientes a las provincias de Jiangsu, Yunnan, Liaoning, Sichuan, China, durante el periodo de 2012-2017 (Gao et al., 2018) y ha sido incluida en este estudio, diseñando un par de cebadores que permiten la amplificación de muestras mutantes con un resultado exitoso, siendo capaz de discriminar entre aislados que presentan la mutación que confiere resistencia a FQ y aislados que son farmacosenesibles.

Se realizó una prueba GenoType MTBDRsl v.1 con la muestra C053 que presenta la mutación Ser91Pro, esta mutación fue identificada por medio de Secuenciación Sanger, Secuenciación de Genoma Completo y también tuvo un resultado exitoso en el ensayo GenoType, además, fue utilizada como control positivo para la estandarización del par de cebadores *gyrA*, logrando la amplificación de la C053 sin amplificar los aislados silvestres; el uso de la técnica MAMA-PCR con el par de cebadores logran identificar la mutación sin necesidad de utilizar prueba GenoType ni secuenciación Sanger o de genoma completo, logrando reducir el costo y el tiempo de espera de los resultados para FQ. Además, la sensibilidad demostrada de los cebadores estandarizados es de 100%, pudiendo detectar muestras farmacorresistentes en aislados y muestras clínicas.

El diseño de cebadores de MAMA-PCR para *M. tuberculosis* permite la correcta discriminación de los alelos silvestre y mutante para siete de los genes asociados a TB-DR, los cebadores que se lograron estandarizar están dentro del esquema de tratamiento de primera y segunda línea de tuberculosis recomendado por la OMS (World Health Organization, 2019). Sin embargo, una de las limitantes de este proyecto ha sido la falta de aislados clínicos que presenten las demás mutaciones, por esto, solo fue posible la estandarización de 7/20 pares de cebadores.

Esta técnica en junto con los cebadores diseñados en este estudio disminuyen el tiempo de espera para la detección de aislados farmacorresistentes a medicamentos de primera o segunda línea del tratamiento antituberculosis, detectando las mutaciones más frecuentes para los genes mencionados con anterioridad, la cual puede ser utilizada en aislados y muestras clínicas de *M. tuberculosis*, además, la aplicación de MAMA-PCR tarda menos tiempo que el cultivo clínico y otras técnicas de diagnóstico tradicional. Asimismo, con el uso de otros cebadores (Bakshi et al., 2005).

Los cebadores diseñados en este estudio tienen el potencial para ser utilizados como diagnóstico molecular, ya que permiten la detección de mutaciones específicas sin necesidad de acudir a técnicas de secuenciación de nueva generación o de genoma completo, las cuales tardan tiempo en llegar, tienen un costo mayor y no siempre se encuentran al alcance de los hospitales. Además, la técnica MAMA-PCR se logró estandarizar de manera exitosa en los equipos portátiles Mini-PCR® y Bluegel®, por lo que se puede realizar la identificación del bacilo de TB y detectar rápidamente si presenta farmacorresistencia sin necesidad de enviar las muestras a hospitales y laboratorios estatales, ya que la técnica de MAMA-PCR en combinación con los cebadores diseñados en este estudio, pueden implementarse en clínicas o centros de salud alejados y en campo, utilizando la técnica como método de diagnóstico rápido para la TB-DR de manera accesible y económica, sin la necesidad de utilizar laboratorios BSL3 ni equipos costosos.

La aplicación de la técnica MAMA-PCR permite reducir el tiempo de espera para la detección de mutaciones asociadas a farmacorresistencia de *M. tuberculosis*, al utilizar los métodos de extracción de ADN y PCR, que pueden ser realizados en un tiempo menor a 72 horas y en menos de 30 horas se puede conocer si se presenta mutaciones en genes asociados a farmacorresistencia en medicamentos de primera y segunda línea. Además, el costo de los equipos portátiles es de USD\$ 950 (www.minipcr.com/product/minipcr-dna-discovery-system), que es aproximadamente una décima parte de un equipo tradicional (www.bio-rad.com). Por lo tanto, aplicación de la técnica MAMA-PCR, puede estar dentro de los diagnósticos POC (Drain, Heichman, & Wilson, 2019), ya que no necesita ser una prueba centralizada y puede ser desarrollada en comunidades rurales y en áreas de escasos recursos (García-Basteiro et al., 2018).

Conclusiones

1. El diseño de cebadores de MAMA-PCR para *M. tuberculosis* permite la correcta discriminación de los alelos silvestre y mutante para siete genes asociados a farmacorresistencia (*rpoB*, *katG*, *embB*, *pncA*, *rpsL*, *gyrA* y *eis*)
2. Con esta técnica se logra reducir el tiempo de espera para la identificación de farmacorresistencia de aislados y muestras clínicas de *M. tuberculosis* a fármacos de primera o segunda línea.
3. La técnica de MAMA-PCR se logró estandarizar de manera exitosa en los equipos portátiles de Mini-PCR y Bluegel.
4. La técnica de MAMA-PCR en combinación con los cebadores diseñados en este estudio, tiene el potencial para implementarse en centros de salud o en campo.
5. Esta técnica puede utilizarse como método de diagnóstico de la TB-DR de manera accesible y económica.

Bibliografía

- Agrawal, M., Bajaj, A., Bhatia, V., & Dutt, S. (2016). Comparative study of GeneXpert with ZN stain and culture in samples of suspected pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(5), DC09-DC12. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18837.7755>
- Al-Marzooq, F., Mohd Yusof, M. Y., & Tay, S. T. (2014). Molecular analysis of ciprofloxacin resistance mechanisms in Malaysian ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates and development of mismatch amplification mutation assays (MAMA) for rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/601630>
- Alonso, R., Mateo, E., Churruca, E., Martinez, I., Girbau, C., & Fernández-Astorga, A. (2005). MAMA-PCR assay for the detection of point mutations associated with high-level erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. *Journal of Microbiological Methods*, 63(1), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.013>
- Bhattacharya, B., Karak, K., Ghosal, A. G., Roy, A., Das, S., Dandapat, P., ... Chakrabarti, S. (2003). Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. *Tropical Medicine and International Health*, 8(2), 150–157. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2003.01007.x>
- Bakshi, C. S., Shah, D. H., Verma, R., Singh, R. K., & 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(3–4), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.05.015>
- Barocio León, Ó. A. (2016). Caracterización molecular de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* en Baja California. Universidad Autónoma de Baja California.
- Cascante, J. A., Pascal, I., Eguía, V. M., & Hueto, J. (2007). Diagnóstico de la infección tuberculosa Diagnosis of tuberculosis infection. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(2), 49–66.
- Caulfield, A. J., & Wengenack, N. L. (2016). Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 4, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2016.05.005>
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., ... Barrell BG, J. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from

thecompletegenomesequence. *Nature*, 393(NOVEMBER), 537–544.
<https://doi.org/10.1038/29241>

- Dolinger, D. L., Colman, R. E., Engelthaler, D. M., & Rodwell, T. C. (2016). Next-generation sequencing-based user-friendly platforms for drug-resistant tuberculosis diagnosis: A promise for the near future. *Int.J.Mycobacteriol.*, 5 *Suppl 1*(2212-554X (Electronic)), S27–S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.09.021>
- Drain, P. K., Heichman, K. A., & Wilson, D. (2019). A new point-of-care test to diagnose tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(8), 794–796.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30053-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30053-2)
- Feuerriegel, S., Schleusener, V., Beckert, P., Kohl, T. A., Miotto, P., Cirillo, D. M., ... Fellenberg, K. (2015). PhyResSE: A web tool delineating Mycobacterium tuberculosis antibiotic resistance and lineage from whole-genome sequencing data. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(6), 1908–1914. <https://doi.org/10.1128/JCM.00025-15>
- Fonseca-Coronado, S., Vaughan, G., Cruz-Rivera, M. Y., Carpio-Pedroza, J. C., Ruiz-Tovar, K., Ruiz-Pacheco, J. A., & Escobar-Gutiérrez, A. (2011). Interleukin-28B genotyping by melt-mismatch amplification mutation assay PCR analysis using single nucleotide polymorphisms rs12979860 and rs8099917, a useful tool for prediction of therapy response in hepatitis C patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7), 2706–2710. <https://doi.org/10.1128/JCM.00877-11>
- Gao, Y., Zhang, Z., Deng, J., Mansjö, M., Ning, Z., Li, Y., ... Xu, B. (2018). Multi-center evaluation of GenoType MTBDRsl line probe assay for rapid detection of pre-XDR and XDR Mycobacterium tuberculosis in China. *Journal of Infection*, 77(4), 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.06.014>
- García-Basteiro, A. L., DiNardo, A., Saavedra, B., Silva, D. R., Palmero, D., Gegia, M., ... Theron, G. (2018). Point of care diagnostics for tuberculosis. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)*, 24(2), 73–85.
<https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.12.002>
- García Ortiz Rosa Alejandra. (2013). Epidemiología molecular de la tuberculosis en baja california, 152. Universidad Autónoma de Baja California.
- HAIN LifeScience. GenoType MTBDRsl ver 2.0 instructions for use. Nehren, Germany: Document IFU-317A-02. HAIN LifeScience; 2015.
- Hillemann, D., Rüscher-Gerdes, S., Boehme, C., & Richter, E. (2011). Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated genexpert MTB/RIF system. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1202–1205.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02268-10>

- Koch, R. (1882). Die Ätiologie der Tuberkulose [The aetiology of Tuberculosis]. Berliner Klinische Wochenschrift.
- Kumari, R., Banerjee, T., & Anupurba, S. (2018). Molecular detection of drug resistance to ofloxacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis* by using multiplex allele-specific PCR. *Journal of Infection and Public Health*, *11*(1), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.03.007>
- Migliori, G. B., Loddenkemper, R., Blasi, F., & Raviglione, M. C. (2007). 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: The new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic? *European Respiratory Journal*, *29*(3), 423–427. <https://doi.org/10.1183/09031936.00001307>
- Morita, M., Ohnishi, M., Arakawa, E., Bhuiyan, N. A., Nusrin, S., Alam, M., ... Watanabe, H. (2008). Development and validation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *Microbiology and Immunology*, *52*(6), 314–317. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00041.x>
- Palomino, J. C., & Martin, A. (2014). Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*, *3*(3), 317–340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030317>
- Pym, A. S., & Cole, S. T. (2007). Mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Bacterial Resistance to Antimicrobials, Second Edition*, *13*(11), 313–342. <https://doi.org/10.2741/1289>
- Qiang, Y. Z., Qin, T., Fu, W., Cheng, W. P., Li, Y. S., & Yi, G. (2002). Use of a rapid mismatch PCR method to detect *gyrA* and *parC* mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, *49*(3), 549–552. <https://doi.org/10.1093/jac/49.3.549>
- Rice, J. P., Seifert, M., Moser, K. S., & Rodwell, T. C. (2017). Performance of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis and rifampin resistance in a low-incidence, high-resource setting. *PLoS ONE*, *12*(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186139>
- Roycroft, E., O'Toole, R. F., Fitzgibbon, M. M., Montgomery, L., O'Meara, M., Downes, P., ... Rogers, T. R. (2018). Molecular epidemiology of multi- and extensively-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Ireland, 2001–2014. *Journal of Infection*, *76*(1), 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.10.002>
- Sandoval-Azuara, S. E. (2017). Análisis genómico de *Mycobacterium bovis* de aislados de humanos y ganado bovino en Baja California. Universidad Autónoma de Baja California.

- Secretaría de Salud, Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018. Programa Sectorial de Salud. 2013, Secretaría de Salud: Diario Oficial de la Federación, México, D.F.
- Sekiguchi, J. I., Miyoshi-Akiyama, T., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Kirikae, F., Toyota, E., ... Kirikae, T. (2007). Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(1), 179–192. <https://doi.org/10.1128/JCM.00750-06>
- Shagufta, I., Zeenat, A., Shahida, H., Yusuf, N. W., & Maleeha, A. (2015). Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay - report from a developing country. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, *31*(1). <https://doi.org/10.12669/pjms.311.6970>
- Solari, L., Jave, O., Castillo, E., Yale, G., Ascencios, L., Quispe, N., & Valencia, E. (2011). Análisis De Costos De Los Métodos Rápidos Para Diagnóstico De Tuberculosis Multidrogosresistente En Diferentes Grupos Epidemiológicos Del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *28*(3), 3–6.
- Sulyok, K. M., Bekő, K., Kreizinger, Z., Wehmann, E., Jerzsele, Á., Rónai, Z., ... Gyuranecz, M. (2018). Development of molecular methods for the rapid detection of antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, *213*(October 2017), 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.026>
- Takiff, H. E., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Wai Mun Huang, Kreiswirth, B., ... Telenti, A. (1994). Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *38*(4), 773–780. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.773>
- Tho, D. Q., Ha, D. T. M., Duy, P. M., Lan, N. T. N., Hoa, D. V., Chau, N. V. V., ... Caws, M. (2008). Comparison of MAS-PCR and GenoType MTBDR assay for the detection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, *12*(11), 1306–1312.
- Vadwai, V., Boehme, C., Nabeta, P., Shetty, A., Alland, D., & Rodrigues, C. (2011). Xpert MTB/RIF: A new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis? *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(7), 2540–2545. <https://doi.org/10.1128/JCM.02319-1>
- Vassall, A., van Kampen, S., Sohn, H., Michael, J. S., John, K. R., den Boon, S., ... Cobelens, F. (2011). Rapid diagnosis of tuberculosis with the Xpert MTB/RIF assay in high burden countries: A cost-effectiveness analysis. *PLoS Medicine*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001120>
- Venter, J. C., Adams, M. D., Sutton, G. G., Kerlavage, A. R., Smith, H. O., & Hunkapiller, M. (1998). -Shotgun sequencing of the human genome [see comments]. *Science*, *280*(5369), 1540–1542. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/280/5369/1540>

- Wejse, C., & Bissau, G. (2014). Point-of-care diagnostics for tuberculosis elimination? *The Lancet*, 383(9915), 388–390. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62003-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62003-6)
- Witney, A. A., Cosgrove, C. A., Arnold, A., Hinds, J., Stoker, N. G., & Butcher, P. D. (2016). Clinical use of whole genome sequencing for *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Medicine*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0598-2>
- World Health Organization; Licence: CC BY-NCcitation. Global tuberculosis report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NCSA, & 3.0 IGO. (2017). *Global tuberculosis report 2017*. Geneva: World Health Organization; 2017. Retrieved from <http://apps.who.int/iris>.
- World Health Organization; Licence: CC BY-NCcitation. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization; *Global tuberculosis report 2019*. Geneva: World Health Organization; 2019. Retrieved from <http://apps.who.int/>
- Zetola, N. M., Shin, S. S., Tumedi, K. A., Moeti, K., Ncube, R., Nicol, M., ... Modongo, C. (2014). Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by genexpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2422–2429. <https://doi.org/10.1128/JCM.02489-13>

Anexos

Glosario de términos	
SIGLA	DEFINICIÓN
AMK	Amikacina: antibiótico de la familia de los aminoglucósidos, se utiliza contra infecciones bacterianas graves.
BSL-3	BioSafety: clasificación de laboratorios según el riesgo biológico o los organismos patógenos que se manipulan en las instalaciones. BSL-3 es un laboratorio de contención nivel 3, para la manipulación e inactivación de muestras de pacientes sospechosos de agentes de alta patogenicidad.
CAP	Capreomicina: antibiótico de la familia de los aminoglucósidos que se utiliza como fármaco de segunda línea en el tratamiento de tuberculosis.
CFU	Unidades Formadoras de Colonias
CTHGT	Clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana
EMB	Etambutol: antibiótico utilizado en el tratamiento de infecciones causadas por Mycobacterias.
FDA	<i>Food and drug administration</i> : agencia del gobierno estadounidense que se encarga proteger la salud pública con base en la regulación de alimentos y medicamentos.
FQ	Fluroquinolonas: fármacos sintéticos quimioterapéuticos, utilizados contra microorganismos que presentan resistencia a los antibióticos.
INH	Isoniacida: fármaco de primera línea utilizado en el tratamiento contra la tuberculosis.
KAM	Kanamicina: antibiótico de la familia de los aminoglucósidos de amplio espectro, actuando en bacterias Gram positivas y negativas, incluyendo el grupo de las Mycobacterias.

LETBC	Laboratorio Estatal de Tuberculosis de Baja California
LiPA	Ensayo de sonda lineal, por sus siglas en inglés, Line Probe Assay, utilizan membranas de nitrocelulosa y tecnología de ADN hibridante.
MAMA-PCR	<i>Mismatch Amplification Mutation Assay</i> : técnica utilizada en biología molecular que requiere el diseño de cebadores que permitan la discriminación entre alelos silvestres y mutantes, mediante la realización de un PCR.
MAS-PCR	Multiplex Allele Specific PCR
MDR	Multi-resistente a los fármacos
MGIT	Tubo indicador de crecimiento de Mycobacterias (por sus siglas en inglés: <i>Mycobacteria growth indicator tube</i>), es una herramienta destinada para el crecimiento, la detección y la recuperación de Mycobacterias para el diagnóstico y tratamiento contra tuberculosis.
MINI-PCR	Termociclador que permite realizar PCR en el campo o escuela, gracias a su diseño compacto y fácil manejo. Cuenta con 8 pozos para colocar tubos con muestras y tiene la eficacia de un termociclador convencional.
mPCR	PCR múltiple (por sus siglas en inglés: Multiplex Polymerase Chain Reaction)
MTBDRsl	Kit comercial, producido por la marca Hain LifeScience, que permite detectar resistencia a fármacos de tuberculosis, mediante la adición de ADN en tiras reactivas y lavado con algunas soluciones.
MTC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : complejo de bacterias tuberculosas que pueden afectar la salud del individuo.
OMS	Organización Mundial de la Salud, perteneciente a las Naciones Unidas cuyo fin es gestionar las políticas de salud a nivel mundial.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>): técnica de biología molecular que permite la amplificación en masa de fragmentos de ADN de interés.
	Plan Nacional de Salud: plan del gobierno mexicano enfocado a

PNS	mejorar y proteger la salud pública.
PZA	Pirazinamida: antibiótico utilizado en el tratamiento de la tuberculosis. Este fármaco se utiliza en compañía con isoniacida, rifampicina o etambutol.
RIF	Rifampicina: antibiótico de primera línea utilizado en el tratamiento anti-tuberculoso.
SCG	Secuenciación del Genoma Completo: proceso de bioinformática que determina la secuencia completa del ADN genómico.)
SM	Estreptomina: antibiótico de la familia de los aminoglucósidos utilizado en el tratamiento contra tuberculosis de bajo espectro.
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
SNP's	Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>): variación en la secuencia de ADN que solamente afecta a una base nitrogenada a la vez, permitiendo así, la variabilidad genética.
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado.
TB	Tuberculosis: enfermedad infecciosa causada por la bacteria <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , su principal vía de contagio es a través del aire y tos, afectando fuertemente los pulmones.
TB-DR	Tuberculosis Resistente: bacterias que presentan algún tipo de resistencia a los antibióticos.
TB-MDR	Tuberculosis Multi-farmacorresistente: tuberculosis que es resistente a los antibióticos de primera línea: rifampicina e isoniacida
TB-XDR	Tuberculosis Extremadamente resistente: es una tuberculosis MDR, pero también es resistente a todas las fluoroquinolonas y al menos a uno de los medicamentos inyectables de segunda línea.
Xpert MTB/RIF	Es un equipo que permite realizar un diagnóstico rápido de la tuberculosis y su resistencia a RIF, basándose en la amplificación de los ácidos nucleicos.

Anexo de Tablas

Anexo Tabla 1. Genes asociados a los fármacos del primera y segunda línea del tratamiento antituberculosis.

Fármacos	Gen	Medicamentos	Abreviatura
Primera línea	<i>rpoB</i>	Rifampicina	RIF
	<i>inhA</i>	Isoniacida	INH
	<i>katG</i>		
	<i>embB</i>	Etambutol	EMB
	<i>pncA</i>	Pirazinamida	PZA
Segunda línea	<i>gyrA</i>	Fluoroquinolonas	FQ
	<i>gyrB</i>		
	<i>rrs</i>	Estreptomicina	SM
	<i>rpsL</i>		
	<i>eis</i>	Amikacina	AMK

Anexo Tabla 2. Cebadores universales utilizados para amplificación de genes asociados a farmacorresistencia de primera y segunda línea en *M. tuberculosis*.

Medicamento	Gen	Secuencia 5'-3'	Secuencia 3'-5'	Tm °C	Tamaño (pb)
RIF	<i>rpoB</i>	AGCGGATGACCACCCAGGAC	TCAGGGGTTTCGATCGGGCA	69.3	266
INH	<i>inhA</i>	GATTCAGCGCATCACCGACC	CCGTCATCCAGTTGTAGGCC	60.1	350
	<i>katG</i>	GCAGATGGGGCTGATCTACG	AACTCGTCGGCCAATTCCTC	65.9	555
PZA	<i>pncA</i>	GGCGTCATGGACCCTATATC	CAACAGTTCATCCCGGTTC	58.0	670
EMB	<i>embB</i>	CGGCATGCGCCGGCTGATTC	TCCACAGACTGGCGTCGCTG	69.3	260
SM	<i>rpsL</i>	GTCAAGACCGCGGCTCTGAA	TTCTTGACACCCTGCGTATC	66.5	272
FQ	<i>gyrA</i>	GATGACAGACACGACGTTGC	GGGCTTCGGTGTACCTCAT	70.8	398
	<i>gyrB</i>	ACGCGAAAGTCGTTGTGACA	TACAAACTCAAGTGGCAGCG	53.5	520

Anexo Tabla 3. Condiciones de reactivos para PCR con cebadores universales (Barocio-León, 2016).

Reactivos	Concentración
nH ₂ O	nanopura
Buffer A Kappa	10 X
dNTPs	10 mM
MgCl ₂	25 mM
Cebador sentido	10 mM
Cebador antisentido	
Taq Kappa polimerasa	5 U/μL
ADN genómico	~20n g/μL

Anexo Tabla 4. Concentraciones de reactivos utilizados en la reacción de MAMA-PCR.

Reactivos	Concentración
nH ₂ O	nanopura
Buffer Accustart II	1 X
dNTPs	1 mM
*MgCl ₂	1.5 mM
Cebador sentido	1 mM
Cebador antisentido	
**DMSO	5%
Taq polimerasa Accustart II	5 U/μL
ADN genómico	~20ng/μL
Total Rx	10 μL

*MgCl₂: en *rpoB* se aumentó a 2 mM.

**DMSO: en *rpoB* no se añade.