



UNIVERSIDAD DE PANAMA  
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO  
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
MULTIDROGORESISTENTE EN LA REPUBLICA DE PANAMÁ  
AÑOS 2002 2004**

TESIS DE MAESTRIA

**SAMANTHA EUNICE ROSAS HERMOSILLA**

Panamá, marzo 2007



UNIVERSIDAD DE PANAMA  
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO  
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
MULTIDROGORESISTENTE EN LA REPUBLICA DE PANAMA  
AÑOS 2002 2004**

**DIRECTORA**

**DRA. NORA ORTIZ DE MORENO**

Departamento de Microbiología  
Universidad de Panamá

**TUTOR**

**MGTR. AMADOR GOODRIDGE**

Departamento de Biología Molecular  
INDICASAT

Tesis presentada para optar al Grado de Master en Ciencias Biomedicas con especialidad  
en Microbiología.

Por la Licenciada **SAMANTHA EUNICE ROSAS HERMOSILLA**

**Panamá, Marzo del 2007**

## DEDICATORIA

*Feliz el hombre que no sigue el consejo de los malvados ni va por el camino de los pecadores ni hace causa comun con los que se burlan de Dios sino que pone su amor en la ley del Señor*  
*Salmo I*

*A mis padres Samuel y Maritza que me dieron la vida, a mis hermanas Paola y Tabatha, a mi sobrina Isabella y a Edwin Pimentel*  
*Unidos por un lazo que va mas alla de la muerte*

### ***Agradecimientos***

*A Dios que ha iluminado mi camino siempre y me ha permitido llegar a donde estoy A mi familia y a Edwin Pimentel por su apoyo incondicional*

*A mis compañeros del Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública por darme la ayuda y orientación necesaria cuando la necesite*

*A mis compañeros de la Sección de Micobacteriología del LCRSP Lic Jaime Bravo y Lic Franklin Gonzalez por el apoyo logístico y técnico en la elaboración de este trabajo pero sobretodo por enseñarme todo lo que hoy se sabe sobre el trabajo con Micobacterias*

*Al Mgtr Amador Goodridge por su asesoría técnica en la elaboración de esta Investigación.*

*Al Programa Nacional para el Control de la Tuberculosis en especial a la Dra. Cecilia de Arango por su interés y apoyo en los datos estadísticos del Programa*

*A la Licda Elvira de Austin (Directora del LCRSP) y al Dr Jorge Motta (Director del ICGES) por brindarme su apoyo*

*A la Dra Nora de Moreno por su asesoría y dirección en esta Tesis*

*A los miembros del Jurado por sus importantes críticas y por su tiempo en evaluar este trabajo de investigación.*

*Finalmente un profundo agradecimiento a todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron para que este día se hiciera realidad.*

## INDICE GENERAL

	Páginas
PORTADA	I
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
INDICE GENERAL	V
INDICE DE FIGURAS DE RESULTADOS	IX
INDICE DE CUADRO DE RESULTADOS	X
INDICE DE ANEXOS	XI
RESUMEN	XII
INTRODUCCIÓN	XIV
<b>CAPÍTULO I</b>	
JUSTIFICACIÓN	1
OBJETIVOS	3
<b>CAPÍTULO II</b>	
GENERALIDADES	4
A AGENTE ETIOLÓGICO	4
B METABOLISMO GENERAL DEL <i>M TUBERCULOSIS</i>	6
1 METABOLISMO LIPIDICO	6
C ASPECTOS INMUNOLOGICOS Y PATOGENICIDAD	8
D MECANISMOS DE TRANSMISIÓN	11
E EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS	13
F DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS	14

**INDICE DE FIGURAS DE RESULTADOS**

	Paginas
F1 Distribución de los aislados de <i>M tuberculosis</i> segun Instalación de Salud	48
F2 Análisis de las pruebas de resistencia de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	49
F3 Porcentaje de pacientes con TB MDR segun año de recolección	50
F4 Distribucion de los pacientes con TB MDR segun grupo de edad	51
F5 Patrones moleculares encontrados por la técnica de DRE PCR	52
F6 Mapa de distribución de los clusters segun región de salud	55
F7 Patrones moleculares encontrados por la técnica de RFLP	57
F8 Vinculos familiares existentes entre miembros de los clusters encontrados durante el estudio	58

**INDICE DE CUADROS DE RESULTADOS****ANEXO A**

	Páginas
<b>Cuadro 1</b> <b>Perfil de Resistencia de aislados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> MDR en Panama</b>	50
<b>Cuadro 2</b> <b>Distribución de los Cluster y Patrones de DRE PCR en Panama.</b>	54
<b>Cuadro 3</b> <b>Comparación de patrones de DRE PCR y de <i>IS6110</i> RFLP en Panama.</b>	56

**INDICE DE ANEXOS****ANEXO A**

	<b>Páginas</b>
<b>AA1</b> <b>Tasa de Incidencia de Tuberculosis en A Latina.</b>	<b>72</b>
<b>AA2</b> <b>Tasa de Incidencia de Tuberculosis en Panamá</b>	<b>73</b>
<b>AA3</b> <b>Formulario de solicitud de investigación micobacteriológica.</b>	<b>74</b>
<b>AA4</b> <b>Casos nuevos de TB y Bk+ en Panamá.</b>	<b>75</b>
<b>AA5</b> <b>Cobertura poblacional de la estrategia TAES en Panamá.</b>	<b>76</b>
<b>AA6</b> <b>Tabla de la información epidemiológica de los pacientes con TB MDR estudiados</b>	<b>77</b>

## **Resumen**

**Introducción** La tuberculosis (TB) ha reaparecido como una de las principales causas de muerte en todo el mundo con casi 3 millones de decesos anuales

La utilización de marcadores biológicos para el estudio de la epidemiología de las enfermedades infecciosas constituye una herramienta importante para la comprensión de la dinámica de transmisión del *M tuberculosis*. En nuestro estudio caracterizamos aislados de TB MDR durante el período 2002-2004 por DRE-PCR.

**Metodología.** En el presente estudio fueron analizados 231 aislados de *Mycobacterium tuberculosis* y se les realizó la prueba de sensibilidad a los antifímicos de acuerdo al método de las proporciones (Canetti et al). Una vez hecho esto fueron seleccionados los aislados resistentes al menos a Rifampicina e Isoniazida (MDR).

El DNA fue purificado por el método de CTAB/NaCl y posteriormente cuantificado por espectrofotometría a 260nm.

El DNA extraído de las cepas de TB-MDR, fue analizado utilizando un protocolo de DRE-PCR modificado (Friedman et al, Montoro et al). Los patrones moleculares y los grupos o clusters fueron confirmados por *IS6110* RFLP (Van Embden et al).

**Resultados.** Los estudios de sensibilidad mostraron que 37 de 231 aislados (16%) resultaron resistentes a Isoniazida (INH) y a Rifampicina (RFP) o a más drogas del tratamiento. El 40.5% de los pacientes con TB-MDR en el estudio presentaron el perfil de resistencia INH, RFP y SM.

Por medio de la caracterización molecular fueron obtenidos 15 diferentes patrones de DRE-PCR agrupados en 6 grupos o clusters de 2-8 bandas en promedio. El 91.8% (34/37) de los aislados fue agrupado dentro de un cluster mientras que solo el 8.2% (3/37) presentó patrones únicos. Los patrones obtenidos por DRE-PCR fueron confirmados por la técnica de Referencia *IS6110*-RFLP a excepción del cluster A donde 2 aislados miembros de éste cluster pasaron a formar parte de un nuevo cluster. Por otro lado el patrón único G por DRE-PCR, fue identificado como miembro del cluster E por *IS6110* RFLP.

**Conclusión** Existe un alto porcentaje de agrupamiento o clustering entre los aislados de MDR TB en Panamá. Por medio del DRE-PCR, pudimos confirmar nexos epidemiológicos entre algunos pacientes que son miembros de un cluster. Demostramos la utilidad del DRE-PCR como herramienta adicional para estudios epidemiológicos del *Mycobacterium tuberculosis* MDR en Panamá.

## **Summary**

**Background** Tuberculosis (TB) has re-emerged as one of the leading causes of death worldwide with nearly 3 million annual cases. The use of molecular biological markers to study epidemiology of infectious diseases has shown to be an important strategy for the understanding of dynamics of transmission. In our study we characterize MDR TB isolates in the 2002-2004 period by DRE-PCR.

**Method** We tested 231 *Mycobacterium tuberculosis* isolates for antibiotic resistance according to proportion method of Cannetti et al. The isolates showing resistance to both Isoniazid and Rifampicin were classified as MDR TB. Genomic DNA was extracted using the CTAB/NaCl method. Molecular characterization was performed using the Double Repetitive Element PCR (DRE-PCR) modified protocol (Friedman and Montoro et al). The fingerprint patterns and clusters obtained were further confirmed by IS6110-RFLP (Van Embden et al).

**Results** We found 37 (16 %) isolates were resistant at least to both Isoniazid (INH) and Rifampicin (RFP) and 40.5% of this MDR TB isolates showed an INH-RFP-Streptomycin resistance profile. DRE-PCR analysis revealed fifteen different fingerprints patterns grouped into 6 clusters comprising 91.8% (34/37) of MDR TB isolates. Only 8.2% (3/37) showed unique DRE-PCR fingerprints patterns. The IS6110-RFLP confirmed virtually all DRE-PCR clusters except cluster A, where two isolates were identified as member of a different new cluster. On the other hand, the unique pattern G isolate obtained by DRE-PCR was identified as member of cluster E by IS6110-RFLP.

**Conclusion** There is a high clustering rate of MDR TB isolates in Panama. The patients infected with these MDR TB isolates are submitted to a long-term illness, which increase the probability of disease transmission. Additionally with DRE-PCR we were able to confirm epidemiologic links between several patients member of a cluster. We demonstrated the utility of DRE-PCR as an additional tool for epidemiological studies of MDR TB.

## INTRODUCCION

La tuberculosis (TB) es una enfermedad de naturaleza infecto-contagiosa de tipo social que ha afectado a millones de personas a nivel mundial. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen unos 10 millones de casos nuevos por año en todo el mundo de los cuales se estima morirán unos 3 millones en una proporción de 150 decesos diarios. La mayoría de estos pacientes son adultos jóvenes en edad productiva. De estos casos, aproximadamente el 95% son habitantes de países en vías de desarrollo ( *OMS 2005 Global Tuberculosis Report* ) Ver (Anexo 1)

A pesar de que la tuberculosis es una enfermedad prevenible y curable continúa siendo un importante problema de salud pública en todo el mundo. En la Región de las Américas cada año se diagnostican 230 000 casos nuevos de tuberculosis y más de 53 000 mueren a causa de esta enfermedad. Además, el control de la tuberculosis enfrenta retos tales como la coinfección tuberculosis/VIH y la creciente multidrogoresistencia, en un contexto caracterizado por la diversidad de la situación epidemiológica, la heterogeneidad de los sistemas nacionales de salud y el diferente grado de desarrollo de los programas nacionales de tuberculosis ( *OMS 2006 National tuberculosis Day* )

Panamá no escapa a esta realidad donde la lucha contra la TB se ha caracterizado como en gran parte de la región latinoamericana, por periodos de altas y bajas en las acciones de control. La enfermedad se concentra en los grupos de población más vulnerables que viven en condiciones de pobreza o pobreza extrema y con dificultad de acceso al sistema de salud como es el caso de gran parte de las comunidades indígenas dispersas

(Anónimo 2004 Notas Informativas PNCTB Panama)

La tendencia de la enfermedad, presenta un comportamiento ascendente en los últimos años al cierre del año 2004 se notificaron 1 653 casos nuevos de tuberculosis, para una tasa de incidencia de 52.1 x 100 000 habitantes cifra superior a la del año 2003 donde se registraron 1 490 casos para una tasa de incidencia de 47.7 x 100 000 habitantes

*(Anónimo 2004 Notas Informativas PNCTB Panama)*

En Panamá, la mayor carga de la enfermedad se concentra en las regiones Metropolitana, San Miguelito Colón Bocas del Toro y en las Comarcas Ngobé Buglé y Kuna Yala, específicamente en los grupos de población socio-económicamente más desfavorecidos y marginalizados, los cuales aportan el 65% de la incidencia nacional La tasa de incidencia en las comarcas indígenas es 3 a 5 veces la tasa del país *(Anónimo 2004 Notas Informativas PNCTB Panama)*

La estrategia del tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES o DOTS por su sigla en inglés) recomendada en todo el mundo para el control de la tuberculosis se está aplicando con éxito en varios países de la Región de las Américas En Panamá se está aplicando desde el año 2000 donde se empezaron a incorporar las primeras regiones de salud, completando ya para el año 2005 una cobertura del 100% del tratamiento supervisado a los pacientes con tuberculosis Su implantación ha permitido considerables avances en la detección y tratamiento de los casos de tuberculosis Sin embargo es necesario seguir supervisando y reforzando esta estrategia para mejorar la cobertura y asegurar la calidad de la atención, a fin de incrementar tanto las tasas de detección como de curación

El Ministerio de Salud en los últimos años ha reforzado el Programa Nacional para el Control de la Tuberculosis (P N C T B ) como evidencia del fuerte compromiso del estado el sector salud y el apoyo de organizaciones y organismos internacionales para enfrentar el reto que representa el control de esta enfermedad en el país

Actualmente no se cuenta con cifras que indiquen el porcentaje de resistencia a los medicamentos antituberculosos en Panamá pues no se han realizado estudios de vigilancia de la resistencia primaria y secundaria en el país.

El Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública (L C R S P ) ha desarrollado las técnicas para el estudio de resistencia a través del método de las proporciones de Canetti Rist y Grosset (*Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública, 2004*) normado internacionalmente por la OMS/OPS para el estudio de la resistencia del *M tuberculosis* Sin embargo dichas pruebas se realizan actualmente con fines clínicos principalmente a pacientes con sospecha de resistencia o multidrogoresistencia.

La TB MDR se ha convertido en un problema de salud pública importante en Panamá Los primeros casos de resistencia empezaron a aparecer en 1973 cuando la estrategia DOTS/TAES no se había implementado como estrategia para el control de la tuberculosis en el mundo Los casos de resistencia se atribuyen principalmente a prescripciones médicas inadecuadas (monoterapia real o encubierta) y al incumplimiento del tratamiento por parte del paciente (*Rattan et al*) Esta situación representa un problema económico importante por el elevado costo que representa para el sistema de salud proveerle al paciente una terapia de segunda línea, por tiempo prolongado además del riesgo de generar resistencia primaria a sus contactos dentro de la comunidad

La utilización reciente de marcadores biológicos para caracterizar aislados de microorganismos, ha facilitado grandemente el estudio de la epidemiología de un sinnúmero de enfermedades infecciosas. Las técnicas moleculares han permitido precisar la distribución de diversas enfermedades infecciosas dentro de la población proporcionando la posibilidad de intervenciones más efectivas para su control. Recientes avances en biología molecular han demostrado que existen diferencias genotípicas y fenotípicas entre distintas cepas de la misma especie constituyéndose así en una herramienta valiosa para la epidemiología convencional.

Diversas pruebas moleculares como Electroforesis de campos pulsados y otros métodos como la Reacción en Cadena de la Polimerasa de Doble elemento repetitivo (DRE PCR) Spolygotyping, Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) han permitido la realización de estudios epidemiológicos en prisiones, refugios, en comunidades, estudios de migración de cepas de tuberculosis alrededor del mundo, estudios de contaminación en los laboratorios y otros, lo que ha permitido obtener información valiosa en cada caso particular (*Montoro et al 1998*).

Hasta hace algunos años, no existían métodos moleculares para la tipificación del *M. Tuberculosis* convirtiendo a éste estudio en el primer protocolo de caracterización molecular de aislados del *Mycobacterium tuberculosis* en Panamá. El conocimiento de la dinámica de transmisión de las cepas TB-MDR sólo podía realizarse a través de la epidemiología convencional.

En el presente estudio caracterizamos molecularmente aislados del *Mycobacterium*

*tuberculosis* MDR por la técnica de DRE PCR para obtener patrones moleculares que fueron posteriormente confirmados por la técnica de RFLP utilizando la secuencia de inserción *IS110*

La técnica de DRE PCR consiste en la amplificación de segmentos de ADN del *Mycobacterium tuberculosis* localizados entre dos copias de elementos repetitivos. Los elementos repetitivos son la secuencia de inserción *IS6110* y la secuencia polimórfica repetitiva GC (*PGRS*) (Friedman et al 1995). Este método constituye una técnica simple económica y rápida, que hemos demostrado ser tan discriminativa como el *IS6110*-RFLP. Por medio de éste estudio evaluamos los perfiles de resistencia de los aislados de TB MDR provenientes de nueve hospitales y centros de salud en Panamá, para luego caracterizarlos molecularmente por DRE PCR y *IS6110*-RFLP.

# **CAPITULO I**

## **JUSTIFICACION**

El incremento de la tuberculosis en la ultima década en la gran mayoría de los países tambien ha afectado a Panamá y junto con la evolución de ésta enfermedad han aparecido casos de pacientes con resistencia a uno o multiples fármacos del tratamiento

La aparición de multidrogoresistencias en pacientes con tuberculosis incrementa las tasas de mortalidad y representan un serio problema para el control de ésta enfermedad

En el año 2004 ingresaron al P N C T B 1 892 enfermos de tuberculosis de los cuales 1653 (87 3% ) corresponden a casos nuevos de tuberculosis para una tasa de incidencia de 52 1 x 100 000 habitantes (Ver anexo 4)

La aplicación de la estrategia TAES (Tratamiento acortado estrictamente supervisado) promovida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha logrado incrementar los indices de curación en un 73% con una reduccion de los abandonos al 11 6% y de los fallecidos en el transcurso del tratamiento al 7 4% Sin embargo y a pesar de todos los avances en nuestra comprensión de las bases de la quimioterapia de la tuberculosis todavia siguen ocurriendo en nuestro país fracasos terapéuticos y un numero considerable de enfermos portadores de cepas resistentes a una o varias drogas antituberculosas

La transmisión de una cepa multidrogoresistente ademas de causar graves problemas de salud al paciente por la toxicidad de algunas drogas utilizadas en los esquemas de retratamiento y de multidrogoresistencia, implica tratamientos prolongados (12 18 meses) significando un costo adicional para el estado pues dicho tratamiento puede costar entre

5 000 10 000 dolares por paciente ya que requiere tratamientos con drogas de segunda linea El tratamiento de la tuberculosis es gratuito para el paciente y en condiciones normales dura 6 meses con un costo aproximado de B./10 00 a B./15 00 dólares por paciente

Esta situación constituye un problema importante de salud publica por la dificultad y costo del tratamiento en éstos pacientes y la posibilidad de transmitir una tuberculosis multidrogoresistente a sus contactos dificultando su tratamiento

Mediante la tipificación y subtipificación de cepas de TB MDR por medio de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa de doble elemento repetitivo (DRE PCR) se identificarán diferentes agrupamientos genéticos (clusters) y patrones individuales (no clusters) entre las cepas estudiadas Los patrones serán de utilidad para determinar nexos epidemiológicos entre los pacientes y al mismo tiempo identificar los factores de riesgo determinantes para la diseminación de las cepas TB MDR en nuestro país

Aunado a esto y con los resultados obtenidos de esta investigación se podrán tomar decisiones importantes en cuanto al reforzamiento y aplicación de actividades básicas encaminadas a controlar la enfermedad tuberculosa en la comunidad para evitar la aparición de nuevas cepas resistentes sirviendo como herramienta de apoyo al sistema de vigilancia en salud para su seguimiento y como pilar para futuros estudios de Epidemiología Molecular de la tuberculosis en Panama

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- 1 Caracterizar molecularmente las cepas de *M tuberculosis* multidrogoresistentes aisladas en Panamá durante el periodo 2002 2004 mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa de Doble Elemento Repetitivo

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Seleccionar las cepas de *M tuberculosis* que presentaron multidrogoresistencia en Panamá durante los años 2002 2004
- 2 Determinar los perfiles de resistencia predominantes en las cepas de TB MDR en Panamá
- 3 Relacionar los patrones moleculares obtenidos mediante la técnica de DRE PCR con los factores de riesgo comunes en los grupos o cluster de las cepas multidrogoresistentes identificadas molecularmente en Panama durante los años 2002 2004
- 4 Comparar los patrones moleculares obtenidos por la técnica de DRE PCR con la técnica de Referencia RFLP
- 5 Determinar los factores de riesgo para adquirir una TB MDR
- 6 Determinar la existencia de nexos epidemiológicos comunes entre las cepas que se agrupan en clusters

## CAPITULO II

### GENERALIDADES

#### A AGENTE ETIOLOGICO

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas que afectan a la especie humana, es responsable de más de 2 millones de muertes y 8 millones de casos nuevos anuales (*OMS 2005 Global Tuberculosis Report*) El microorganismo productor de la enfermedad es uno de los exponentes más fieles de la presión selectiva a la que han sido sometidas muchas especies y de una capacidad de adaptación a medios adversos realmente insuperable (*Camínero 2002*)

El *Mycobacterium tuberculosis* es un microorganismo que se incluye taxonómicamente en el orden Actinomycetales y es miembro de la familia Mycobacteriaceae La tuberculosis es producida por uno de los cuatro microorganismos que integran el complejo *M tuberculosis* y que son *M tuberculosis* *M. bovis* *M africanum* y *M microti*<sup>35</sup> Sin lugar a dudas la TB producida por *M tuberculosis* es la más importante desde el punto de vista de salud pública y la que produce la gran mayoría de los cuadros clínicos de ésta enfermedad

*M tuberculosis* es un microorganismo intracelular con forma bacilar aerobio estricto Su crecimiento está subordinado a la presencia de oxígeno y al pH circundante Es resistente al frío congelación y a la desecación siendo por el contrario muy sensible al calor luz solar y luz ultravioleta. Su tiempo de duplicación es muy lento (14-24 horas) y

ante circunstancias metabólicas adversas entra en un estado latente o durmiente pudiendo llegar a demorar su multiplicación desde varios días hasta muchos años

La secuencia genómica de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37RV se ha determinado y analizado para incrementar nuestro entendimiento de la biología de este patógeno de crecimiento lento y para ayudar en la concepción de nuevas intervenciones profilácticas y terapéuticas. El genoma del *Mycobacterium tuberculosis* contempla alrededor de 4 000 genes y tiene un contenido alto de guanina más citosina, reflejado en el contenido amplio de proteínas. *M. tuberculosis* difiere radicalmente de cualquier bacteria ya que gran parte de su capacidad de codificación, está dedicada a la producción de enzimas envueltas en lipogénesis y lipólisis y a dos nuevas familias de proteínas ricas en glicina con una estructura repetitiva lo que puede representar una fuente de variación antigénica. (Weltman et al 1994)

## **B METABOLISMO GENERAL DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Basándose en la secuencia del genoma del *Mycobacterium tuberculosis* es claro que el bacilo tuberculoso tiene el potencial de sintetizar todos los aminoácidos esenciales, vitaminas y cofactores enzimáticos. Puede metabolizar también una variedad de carbohidratos, hidrocarburos, alcoholes, cetonas y otros ácidos carboxílicos. Aparentemente de acuerdo con la descripción del genoma, no solo presenta enzimas involucradas en el metabolismo lipídico sino también aquellas para la glucólisis, un gran número de hasta 200 oxidoreductasas, oxigenasas y deshidrogenasas, citocromo P450. Bajo condiciones aeróbicas de crecimiento se genera ATP por fosforilación oxidativa. Componentes de algunas cadenas anaeróbicas fosforilativas de transporte de electrones también están presentes, incluyendo genes para nitrato reductasa (*narGHJI*) fumarato reductasa (*frdABCD*) y posiblemente nitrito reductasa (*nirBD*) así como una nueva reductasa (*narX*). Dos genes que codifican proteínas parecidas a las de la hemoglobina, pueden jugar un papel protector al estrés oxidativo o estar involucrados en la captura del oxígeno. La habilidad del *Mycobacterium* spp de adaptar su metabolismo a cambios en el ambiente es significativa pues no solo debe competir con el pulmón por oxígeno sino también adaptarse al ambiente anaeróbico/microaerófilo del granuloma. (Cole et al 1993)

### **1 Metabolismo lipídico**

*Mycobacterium tuberculosis* presenta una estructura química muy particular donde el componente proteico de su pared es el sustrato fundamental que produce el fenómeno de hipersensibilidad retardada al aplicar el derivado proteínico purificado (PPD) intradérmicamente, condicionando así la aparición de la reacción tuberculínica.

Muy pocos microorganismos producen un arreglo tan diverso de moléculas lipofílicas como el *Mycobacterium tuberculosis*. Estas moléculas van de ácidos grasos simples como el palmitato y tuberculoesteratos hasta isoprenoides y moléculas complejas de cadena larga como los ácidos micólicos y alcoholes como el fenolftuoceroil que esterifican conjuntamente con el ácido micoserósico para formar una especie de andamio para la unión de los micosidos. Se cree existen alrededor de 250 enzimas diferentes involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos en *M. tuberculosis* solo comparada con *E. coli* (Weltman et al 1994 Cole et al 1993)

Es el ácido micólico el más característico y responsable de la peculiaridad de su tinción lo que lo hace resistente a la decoloración de allí la denominación bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) característica que comparte con otras especies como *Nocardia* (Fenton et al 1998 Steck et al 1978)

## C ASPECTOS INMUNOLÓGICOS Y PATOGENICIDAD

El macrófago alveolar (MA) es la <sup>4</sup>célula clave en la respuesta inmunológica a la TB. Este MA habiendo ingerido exitosamente el bacilo procesa antígenos bacterianos y los presenta a los linfocitos T específicos. Las células T toman parte en la activación y regulación de los macrófagos y subsecuentemente en el control del crecimiento micobacteriano. La respuesta TH1 que constituye la respuesta inmune protectora a *M tuberculosis* se encuentra controlada por interleuquina 1 e interleuquina 12 mediada por células T CD4 secretando interleuquina 2 e interferón gamma interferón (Figueroa et al 2001)

La respuesta inmune controla, pero no elimina al patógeno. La falta de una respuesta inmune apropiada da como resultado una tuberculosis aguda activa. En la mayoría de los casos de infección por *M tuberculosis* el individuo permanece asintomático y no infeccioso. Esta latencia clínica a menudo se extiende durante toda la vida del individuo. Sin embargo la reactivación de la infección latente puede ocurrir en respuesta a perturbaciones de la respuesta inmune produciendo enfermedad activa. La infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) la diabetes mellitus el tratamiento con corticosteroides el envejecimiento y el abuso de drogas u alcohol aumentan el riesgo potencial de reactivación de enfermedad latente (Munk et al 1991)

*M tuberculosis* persiste en los macrófagos dentro de un granuloma en los huéspedes infectados. El granuloma consiste en macrófagos y células gigantes células T células B y fibroblastos. En las infecciones latentes se desconoce el estado de actividad de la bacteria dentro del granuloma o tubérculo. El microorganismo puede estar en un estado

inactivo sin replicarse replicándose activamente pero limitado por la respuesta inmune o metabólicamente alterado con ciclos replicativos infrecuentes o limitados. La alteración de la respuesta inmune puede resultar en la reactivación y replicación del bacilo con necrosis y daño al tejido pulmonar. La respuesta inmune es capaz de prevenir la enfermedad activa en la mayoría de las personas, pero no elimina la infección. El microorganismo ha desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune mediada por células. Una de las estrategias en la generación de vacunas es poder incrementar la respuesta inmune natural producida por *M. tuberculosis* (Munk et al 1991)

El 90% de los pacientes infectados podrán controlar el estado latente de los bacilos por medio de sus defensas inmunes sin embargo un 5% de estas personas presentará la enfermedad en estados tardíos de la vida en lo que se denomina TB de reactivación. Estas condiciones son las que le han ayudado a subsistir en la especie humana por muchos años o para siempre (Daniel et al 1993)

La enfermedad primaria se desarrolla dentro de los primeros cinco años de la infección inicial la cual estimula inmunidad específica, demostrada por el surgimiento de una respuesta cutánea positiva al derivado proteico purificado de tuberculina. Aunque los síntomas de enfermedad primaria pueden ser pocos la detección temprana y el tratamiento son importantes para prevenir el desarrollo de complicaciones inmediatas las cuales pueden resultar en un elevado riesgo de morbimortalidad y para prevenir también

la diseminación de la infección posterior a la reactivación de la enfermedad (*Daniel et al 1993*)

Dado el grado de diseminación de la tuberculosis en todo el mundo la vacunación no es solo una prioridad sino que permanece como la única intervención real desde el punto de vista de la salud pública, que influye tanto en la incidencia como en la prevalencia de la enfermedad. Se han desarrollado muchas vacunas que son prometedoras incluyendo la vacunación con DNA utilización de proteínas de superficie como inmunógenos formas recombinantes del BCG o incluso utilizar el *M tuberculosis* atenuado. Todos éstos constituyen ensayos en estudio desarrollados para tratar de controlar la enfermedad.

## **D MECANISMOS DE TRANSMISIÓN**

El mecanismo de transmisión más importante y causal de casi la totalidad de los contagios es la vía aerógena, a través de la eliminación de microgotas (Gotas de Pfluger) las cuales oscilan entre 5 10 $\mu$ m de las cuales las más peligrosas constituyen aquellas producto de la condensación de las más grandes (1 5 $\mu$ m de diámetro) las cuales al perder su contenido de agua, que contienen de 1 5 bacilos por microgota, son realmente infecciosas pues ingresan por la respiración a los pulmones y se depositan en la región alveolar (*Camirero 2002 Guevara et al 2003*)

A través de estas microgotas es como el *Mycobacterium tuberculosis* entra a los alvéolos pulmonares donde su primer contacto se da con los macrófagos residentes sin embargo es posible también que en primera instancia, sean ingeridos por pneumocitos alveolares epiteliales tipo II Estas células se encuentran en numero mayor que los macrófagos en los alvéolos (*Smith et al 2003*)

Es en la parte distal del pulmón donde *M tuberculosis* encuentra las condiciones ideales para multiplicarse Los macrófagos en primera instancia y posteriormente los linfocitos en la mayoría de los casos lograrán detener su multiplicación pero en otras la inmunidad será evadida y se producirá una tuberculosis primaria.(*Fenton er al 1996*) Durante éste período el paciente presentará sintomas fácilmente confundibles con otras patologias sin embargo el médico debe sospechar de una tuberculosis sobre todo si es un paciente mayor de 15 años con fiebre tos y expectoracion por más de 15 dias El diagnóstico de la TB debe basarse en la clinica y en la confirmación de la misma mediante técnicas

microbiológicas las cuales constituyen las técnicas más utilizadas en nuestro país para confirmar la enfermedad (*Guevara et al 2003 Ramachandran et al 2003*)

## **E EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS**

La tuberculosis sigue siendo un grave problema de salud a nivel mundial en el año 2002 se reportaron 233 648 casos de tuberculosis equivalente a una tasa de 27 casos por 100 000 habitantes La aplicación de la estrategia TAES (Tratamiento acortado estrictamente supervisado) promovida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha logrado incrementar los índices de curación en un 73% con una reducción de los abandonos al 11 6% y de los fallecidos en el transcurso del tratamiento al 7 4% (*Anonimo 2004 Notas informativas PNCTB*)

La cobertura poblacional de la estrategia DOTS/TAES es del 73% con algunas variaciones subregionales importantes como la reportada en Brazil donde las coberturas de TAES solo alcanza el 23 al 25% Las ventajas de la aplicación de la estrategia DOTS/TAES en la región son evidentes, se reporta éxito en el tratamiento de 83% en el 2001 en los países que aplican TAES comparado con el 59% en los que no lo hacen (*OPS 2004 Reporte Global de la tuberculosis*)

El incremento de la tuberculosis en la última década en la gran mayoría de los países también ha afectado a Panamá y junto con la evolución de ésta enfermedad han aparecido casos de pacientes con resistencia a uno o múltiples fármacos del tratamiento

En el año 2004 ingresaron al P N C T B 1 892 enfermos de tuberculosis de los cuales 1653 (87 3%) corresponden a casos nuevos de tuberculosis para una tasa de incidencia de 52 1 x 100 000 habitantes (Ver Anexo 2)

## **F DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS**

A pesar de existir diversas técnicas para el diagnóstico de la enfermedad y que han habido grandes avances en los últimos 20 años la base del diagnóstico y el seguimiento de la TB en países con escasos y medios recursos económicos sigue siendo la baciloscopia mediante la técnica de Ziehl Neelsen. Esto se debe a que es una técnica sencilla, rápida, reproducible de bajo costo y sobretodo porque detecta los casos contagiosos de la comunidad (Caminero 2002 WHO TB 1998). Por otro lado como técnica básica está el cultivo el cual además de ser sumamente económico tiene una alta sensibilidad y especificidad. En cuanto a la identificación de las diferentes especies de micobacterias, la misma se puede realizar por pruebas bioquímicas las cuales son las más utilizadas por ser las más económicas. Otras técnicas utilizadas son las pruebas moleculares, la cromatografía de capa fina y las pruebas inmunológicas (*Katoch et al 2003 Kaul et al 2001 WHO/TB 2004 Ramachandran et al 2003 Soini 2001*). Cabe destacar que el aporte de la microbiología al diagnóstico de la tuberculosis va a depender de la calidad de las muestras recolectadas para el examen y de las diferentes técnicas que se empleen (*WHO TB 98*).

### **1 METODOS CONVENCIONALES Y NO CONVENCIONALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS**

Los métodos para el diagnóstico de la tuberculosis pueden clasificarse en convencionales y no convencionales

## **1 1 Métodos Convencionales**

**1 1 1 La Baciloscopía** La característica de alcohol ácido resistente en extendidos y examinadas al microscopio es la primera evidencia de la presencia de Micobacterias en la clínica. Existen diferentes tinciones entre las que se encuentran la técnica de Kinyoun en frío y la más recomendada la clásica técnica de Ziehl Neelsen técnica en la cual el bacilo tuberculoso se observa como pequeños bastones o bacilos de color rojo sobre un fondo de tonos azulados. Es una técnica sencilla, económica y reproducible en cualquier medio (*Camínero 2002*)

**1 1.2 El Cultivo** El cultivo puede realizarse en la actualidad en medios sólidos o líquidos por medio de métodos automatizados o convencionales. El medio de cultivo más utilizado es el medio sólido de Lowenstein Jensen. También pueden utilizarse los medios de agar 7H10 y 7H11 de Middlebrook (*Camínero 2002*)

## **1 2 MÉTODOS NO CONVENCIONALES**

**1 2 1 Tinción con fluorocromos (auramina)** la cual es igual de eficaz que la técnica de Ziehl Neelsen y también se basa en el principio de alcohol ácido resistencia (*Camínero 2002*)

**1 2 2 Medios de cultivo líquidos** Medios de cultivo radiométricos Bactec 460TB y no radiométricos MGIT (Mycobacterial growth indicator tube) ESP culture system II Myco Sistema MB BactT Mycobacteria Detection Bactec 900 MB System (*Camínero 2002 Soimi 2001*)

**1 2.3 Medios de cultivo bifásicos no radiométricos (MB Septi-Check)** Sistema bifásico para cultivo de Micobacterias con sensibilidad y rapidez similar al Bactec pero sin la utilización de isótopos radiactivos (*Camínero 2002 Somi 2001*)

## **2 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS**

La identificación de Micobacterias puede realizarse mediante pruebas bioquímicas o técnicas moleculares a base de PCR o Sondas

**2 1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS** Existen tres pruebas bioquímicas básicas para identificación del *Mycobacterium tuberculosis* la Prueba de la acumulación de la Niacina, Reducción de Nitratos y la Prueba de la Catalasa. El *Mycobacterium tuberculosis* es Niacina + Nitrato + y catalasa a 68 C negativo Existen otras pruebas para la identificación de las Micobacterias atípicas entre las que podemos mencionar Prueba de la urea, hidrólisis del Tween toma de hierro prueba de arilsulfatasa, Prueba de B-Galactosidasa, prueba de Telurito de Potasio y otras conjuntamente con la rata de crecimiento y crecimiento a diferentes temperaturas necesarias para su identificación La ventaja de estas pruebas es que son economicas sin embargo pueden demorar hasta 2 meses en dar un resultado (*LCRSP 2004*)

## **2.2 MÉTODOS COMERCIALES**

**2 2 1** El test de Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* (Roche Diagnostic Systems Inc New Jersey USA) Es una técnica basada en DNA que amplifica el gen RNA ribosomal 16S utilizando cebadores específicos y la detección es por medio de una reacción colorimétrica. (*Somi et al 2001*)

**2.2.2** Identificación por sondas genéticas MTD Gen Probe (Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test, California USA) utiliza sondas específicas del fragmento de ADN de la micobacteria que se quiere amplificar. Las sondas están marcadas con isótopos radioactivos (sondas calientes) o sustratos cromogénicos (sondas frías) (Soimi et al 2001)

**2.2.3** Técnicas de PCR en Tiempo Real Son métodos basados en la hibridación de ácidos nucleicos amplificados con sondas fluorescentes en regiones del DNA de interés que son monitoreadas dentro del termociclador. La señal fluorescente es directamente proporcional al fragmento amplificado dentro del tubo de reacción (Soimi et al 2001)

### **3 DIAGNÓSTICO DE LA DROGORESISTENCIA**

La detección temprana de la resistencia en TB permite un tratamiento apropiado lo que lleva a un gran impacto en el control de la enfermedad. La TB MDR constituye uno de los mayores retos para el control de la TB.

#### **3.1 METODOS FENOTÍPICOS**

**3.1.1** Método de las proporciones de Canetti, Rist y Grosset Este método utiliza el medio de Lowenstein Jensen ya sea mediante técnica indirecta con la siembra de varias diluciones centecimales o directa en muestras con gran carga bacilar. Es el único método recomendable para países de escasos o medios recursos económicos y el utilizado como Gold Standard en la mayoría de los países de América Latina. (LCRSP 2001)

**3.1.2** Sensibilidad en medios 7H10 o 7H11 de Middlebrook Este método utiliza placas con medios semisintéticos de Middlebrook (Caminero 2002)

**3 1 3 Sistema E-Test** Este método dispone de tiras impregnadas con concentraciones crecientes de diferentes antimicrobianos. La suspensión de la micobacteria se distribuye sobre platos con medio 7H11 de Middlebrook.

**3 1 4 Sensibilidad en medios líquidos** Entre ellos el sistema Bactec 12B ESP II MB BacT MGIT Bactec 900 MB (*Camirero 2002*)

**3 1 5 Ensayos basados en la utilización de Fagos** Ambos sistemas Las pruebas basadas en la amplificación del fago (Sistema *PhaB* phage amplified biologically) y ensayos con luciferasa (Luciferase reporter phage assay) En el primero se utiliza un micobacteriófago que presenta un ciclo lítico en *M tuberculosis* y *M smegmatis* En los ensayos con Luciferasa, las micobacterias vivas son infectadas por micobacteriófagos TM4 que expresan el gen luciferasa y tras adición de sustrato de luciferina, emiten fotones de luz La cantidad de luz es proporcional al número de bacilos viables Si las micobacterias se ponen en contacto con un fármaco antituberculoso al que son sensibles serán destruidas y los fagos no las podrán infectar dejando de emitir luz (*Soim et al 2001*)

## **3 2 METODOS GENOTÍPICOS**

Estos métodos buscan determinantes genéticos de resistencias en lugar de buscar el fenotipo de resistencia e involucra dos pasos básicos Una amplificación de ácidos nucleicos como PCR para amplificar secciones del genoma de *M tuberculosis* que se saben estarán alteradas en cepas resistentes y un segundo paso de atribuir los productos amplificados a mutaciones específicas correlacionándolas con resistencia

- 3.3.3 Secuenciamiento de ADN** El secuenciamiento del DNA de fragmentos de PCR amplificados ha sido ampliamente utilizado y de hecho constituye la técnica de Gold Standard para la detección de mutaciones. Se ha realizado por procedimientos manuales y automatizados donde el más utilizado es el método automatizado. Ha sido ampliamente utilizado para caracterizar mutaciones en el gen *rpoB* en cepas resistentes a rifampicina y para detectar mutaciones responsables de la resistencia a otras drogas antituberculosas (Somi et al 2001)
- 3.3.4 Técnicas de Hibridización en Fase Sólida** Existen dos técnicas comerciales de este tipo. Hibridización en Fase Sólida (INNO LiPA Rif TB Assay Innogenetics Ghent Belgium) para la detección de resistencia a Rifampicina y el GenoType MTBDR assay (Hain Lifesciences, Nehren Germany) para la detección simultánea de la resistencia a Isoniazida y Rifampicina. (Somi et al 2001)
- 3.3.5 Microarreglos (Microarrays)** También es una técnica de hibridización en fase sólida, se conoce como biochips y ha sido propuesta como un método molecular para la detección de drogoresistencia en *M tuberculosis*. Está basado en la hibridización de ADN obtenido de muestras clínicas a oligonucleótidos immobilizados en un soporte sólido como placas de vidrio miniaturizadas. Han sido utilizadas principalmente para detectar resistencia a Rifampicina. (Somi et al 2001)
- 3.3.6 Técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real** Estas técnicas también han sido introducidas para la rápida detección de

resistencia Se han utilizado diferentes sondas como TaqMan sondas de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) y biosondas Las ventajas de ésta técnica son la rapidez y la baja tasa de contaminación Las principales desventajas son los equipos reactivos costosos y personal capacitado (*Soimi et al 2001*)

## **G TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS**

El tratamiento de la TB es la piedra angular de todo programa nacional de lucha antituberculosa. La estrategia moderna de tratamiento de la TB se basa en regimenes normalizados de quimioterapia antituberculosa de corta duración aplicados en condiciones apropiadas de vigilancia de los casos

El tratamiento de la TB se fundamenta en dos grandes bases bacteriologicas que son la asociacion de fármacos para evitar la selección de resistencias y la necesidad de tratamientos prolongados para matar a todos los bacilos en sus diferentes fases de crecimiento metabólico Estudios microbiológicos en las décadas del 50 y 70 llevaron a la conclusion de que el mejor tratamiento para un paciente con TB sensible es 2 meses con Isoniazida, Rifampicina, Etambutol y Pirazinamida luego 4 meses con Isoniazida y Rifampicina. La Isoniazida y la Rifampicina son dos de las drogas antituberculosas más potentes matan más del 99% de los bacilos tuberculosos en dos meses del inicio de la terapia Junto con éstas drogas la Pirazinamida con un efecto esterilizante actua sobre los bacilos durmientes o latentes los cuales no mueren bajo la acción de las otras drogas antituberculosas (18 molecular perspectivas of MDR) Dentro del tratamiento para la TB es de gran importancia seguir los tratamientos estrictamente con la asociación de las 4 drogas asi como también un tratamiento supervisado para evitar abandonos (*Camirero 2002 WHO TB 2003*) En el caso de los pacientes con TB MDR, los pacientes responden pobremente a una terapia de corto plazo pues necesitan ser tratados intensamente hasta por 24 meses con un régimen basado en drogas antituberculosas de reserva o de segunda linea Dicho tratamiento con drogas de reserva, es mucho más caro y tóxico que el tratamiento con drogas del esquema tradicional El regimen de retratamiento debe incluir

por lo menos 4 drogas nunca usadas por el paciente incluyendo un agente inyectable (Capreomicina, Amikacina o Kanamicina) y fluorquinolona en la fase inicial y 3 de las drogas más activas y toleradas en la siguiente fase. Una fase inicial de 6 meses debe seguirse de una fase de 12-18 meses (*WHO 2003*)

## **1 RESISTENCIA EN TUBERCULOSIS**

Si en una tuberculosis se inicia tratamiento con un solo medicamento tras una primera fase en la que se eliminarán la mayoría de los bacilos, el paciente mejorará, sin embargo se producirá una selección de bacilos resistentes que en poco tiempo llegarán a ser la población dominante invalidando así el medicamento para el paciente pues la resistencia en tuberculosis es cromosómica, definitiva e irreversible (*Caminero 2002*). Existen tres conceptos diferentes dentro de las resistencias: *Resistencia Natural* que es la que presentan las cepas salvajes como fruto de su multiplicación continua. La *Resistencia Adquirida o Secundaria* que es cuando la selección de los fármacos se produce por una mala terapia (monoterapia real o encubierta) la *Resistencia Primaria o Inicial* es la que se produce cuando un paciente portador de una resistencia adquirida contagia a un paciente que previamente no ha tomado ningún tratamiento antituberculoso. Por último cuando un paciente presenta resistencia al menos a Isoniazida y Rifampicina se le denomina como paciente multidrogoresistente (*Cole et al 1994 Comité asesor de la OPS/OMS 1986 Iseman et al 1992 Ramachandran et al 2003*). Esta última constituye un gran problema de salud pública pues su transmisión e infectividad es muy similar a la de los bacilos sensibles (*Ashok et al 1996 Kochi et al 1993*)

El análisis genético y molecular de la drogoresistencia en *M tuberculosis* sugiere que la resistencia es adquirida por el bacilo tanto por alteración del blanco de la droga a través de mutación o por bloqueo de la droga a través de sobreproducción del blanco (*Rattan et al 1998*)

La TB MDR resulta primariamente de la acumulacion de mutaciones en blancos de droga de genes individuales (Tabla 1)

**Tabla 1 Mutaciones en blancos de droga de genes individuales de *M tuberculosis***

Druga	Gen	Producto	En cepas resistentes (%)
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Subunidad B de la RNA Polymerasa	Mayor de 95
Isoniazida	<i>KatG</i> <i>oxyR</i> <i>ahpC</i>	Catalasa-Peroxidasa Alkyhidro-reductasa	60-70 +/- 20
Streptomycina	<i>rpsL</i> <i>rrs</i>	Proteína ribosomal S12 16s rRNA	60 Menos de 10
Fluorquinolona	<i>gyrA</i>	DNA girasa	Menos de 90
Pyrazinamida	<i>pncA</i>	Amidasa	70-100
Ethambutol	<i>embCAB</i>	EmbCAB	69

*Rattan et al Multidrug Resistant Mycobacterium tuberculosis Molecular perspectives*

En la actualidad gracias a las técnicas de Biología Molecular se ha podido demostrar que el gen que está alterado en el 90-98% de los casos de tuberculosis resistente a Rifampicina es el gen *rpoB*. Se desconoce si los aislados de *M tuberculosis* resistentes a

Rifampicina exhiben presencia o ausencia de algún fenotipo pleiotrópico en particular. Se cree que éste gen no codifica ninguna actividad vital para la virulencia ni la supervivencia del bacilo por ello la resistencia a Rifampicina no se traduce en una disminución de la virulencia, es decir la cepa será capaz de infectar, transmitir y producir enfermedad de manera normal (*Ashok et al Camunero 2002 Levin et al 1993 Morris et al 1995*). Se conoce que la mayoría de las veces la resistencia a Rifampicina va ligada con la resistencia a Isoniazida por lo que ante un caso de resistencia a Rifampicina se puede esperar con el tiempo una resistencia a Isoniazida convirtiéndose el paciente en un portador de una cepa multidrogoresistente.

En el caso particular de los casos de TB resistente a Isoniazida, participan varias mutaciones genéticas donde la más frecuente es la del gen *KatG* el cual condiciona la actividad catalasa y peroxidasa del bacilo por lo cual al presentarse la mutación el bacilo no sólo será resistente a Isoniazida, sino que carecerá de la actividad de ambas enzimas vitales para su supervivencia, lo que se traduce en una disminución de la virulencia del bacilo tuberculoso. En los casos en los que la resistencia a Isoniazida sea codificada por otros genes (*inhA, ahpC, kasA*) los bacilos serán igualmente transmisores infectantes y patógenos. (*Ashok et al 1998 Camunero 2002 Sherman et al, 1996 WHO/TB/2006 Zhang et al 1992*)

## **1.1 RESISTENCIA A RIFAMPICINA**

La Rifampicina (RIF) fue introducida para terapia antituberculosa en los inicios de los años 1970 y es un importante componente del régimen de tratamiento contra la TB. Debido a su acción bactericida potente la RIF conjuntamente con la INH, forman la base de la terapia antituberculosa, por lo que la resistencia a Rifampicina

puede ser asumido como una antesala a la multidrogoresistencia. Basándose en estudios detallados de la estructura funcional de *Escherichia coli* en la actualidad se conoce que el mecanismo molecular de la actividad de la RIF envuelve la inhibición de la ARN polimerasa dependiente de ADN (Gale et al 2001 Winder et al 2002). La RIF se une a la subunidad B de la ARN polimerasa de la *E. coli* y resulta en la inhibición de la transcripción. Estudios genéticos muestran que las cepas de *E. coli* resistentes a RIF tienen mutaciones sin sentido y pequeñas deleciones en el gen *rpoB* (Lisitsyn 1984). Posteriormente Telenti y colaboradores (Telenti et al 1993) clonaron y secuenciaron la región del gen de *M. tuberculosis* encontrando que todas las mutaciones en el gen al igual que para *E. coli* eran mutaciones sin sentido y sustituciones de los aminoácidos en una de dos posiciones (526 y 531) lo que fue encontrado en el 80% de las cepas. Posteriormente Levin y Hatfull utilizaron ARN polimerasa purificada de *M. smegmatis* (cepa mc<sup>2</sup> 155) y demostraron que la RIF específicamente inhibe la elongación de transcritos largos y no tiene efecto sobre la iniciación de la transcripción (Rattan et al 1998).

## 1.2 RESISTENCIA A ISONIAZIDA

A pesar que la Isoniazida (INH) fue sintetizada por primera vez a principios de este siglo no fue sino hasta 1950 cuando fue introducida como una droga antituberculosa. La INH y la RIF conjuntamente forman la base de la terapia antituberculosa globalmente. Investigadores han concluido que la resistencia en un grupo de *M. tuberculosis* resistentes a INH se debe a la pérdida completa del gen *KatG*. Sin embargo también observaron por análisis Southern que muchas de las

cepas resistentes a INH tenían intacto el gen *KatG*. En estas cepas los niveles de catalasa y peroxidasa para estos microorganismos estaba disminuida. (Zhang *et al* 1992) Estas observaciones han sugerido que para muchas cepas un simple cambio en un par de bases como en mutaciones sin sentido mutaciones puntuales o pequeñas deleciones estaban asociadas con resistencia. Muchos estudios sugieren que la INH inhibe la biosíntesis de los ácidos micólicos de la pared celular haciendo a la micobacteria susceptible a radicales de oxígeno reactivo y otros factores del ambiente. La activación de INH a un intermediario electrofílico inestable requiere de la enzima catalasa peroxidasa (KatG codificada por el gen *katG*) y una fuente de electrones (peróxido de hidrógeno) (Shoeb *et al* 1985) la hidracina que se forma después que la INH espontáneamente se descompone puede también mediar la activación de INH. Sin embargo el gen que produce KatG es la única enzima capaz de activar INH y consecuentemente las cepas de *M. tuberculosis* con KatG mutante son invariablemente resistentes.

## **H CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL *Mycobacterium tuberculosis***

Se han descrito innumerables ensayos para la caracterización molecular de éstos mutantes resistentes la mayoría de las veces a través de la utilización de marcadores genéticos para la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis* dentro de la misma especie de gran utilidad para estudios epidemiológicos (Kapur *et al* 1994 Williams *et al* 1994) La necesidad de encontrar métodos rápidos y sensibles constituye un desafío ante el incremento de la tuberculosis y su asociación con el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) En la actualidad el método más utilizado para la diferenciación de cepas de

## **1 MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS MOLECULARES**

### **1.1 POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN**

#### **IS6110**

Este marcador fue inicialmente descrito en 1989 (*Thierry et al 1990*) Comprende 1355 pares de bases y pertenece a la familia de secuencias de inserción IS3 Tiene dos marcos abiertos de lectura y codifica para proteínas necesarias para la transposición El número de copias de IS6110 va de 0-25 y las posiciones en el cromosoma de *M tuberculosis* son altamente variables entre aislados diferentes (*Van Soolingen 1993*)

### **1.2 SECUENCIA REPETITIVA POLIMORFICA RICA EN GUANINA Y CITOSINA (PGRS) DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN**

La identificación de PGRS presente en cluster cromosómicos múltiples posibilita el desarrollo de un segundo sistema de tipificación por medio de RFLP Este ha mostrado tener un poder discriminatorio cercano al del tipado IS6110 incluso en aislados con pocas copias de IS6110 (*Yang et al 2001 Caminero 2002*)

### **1.3 SPOLIGOTYPING**

Esta técnica flanquea una secuencia llamada DR compuesta por un elemento de 36 pares de bases separadas por secuencias no repetitivas cortas es una técnica basada en PCR (*Hermans et al 1992 Kamembeerk et al 2001*) Utiliza un par de cebadores y simultáneamente amplifica todas las secuencias repetitivas únicas o espaciadores localizados entre elementos repetitivos La presencia o ausencia de estos espaciadores es determinada por hibridización Southern Las cepas

individuales son distinguidas por el número de espaciadores ausentes del set completo de espaciadores, el cual es definido secuenciando esta región de un gran número de cepas de *M. tuberculosis*. Se recomienda la utilización de ésta técnica como un screening antes de aplicar una técnica secundaria con un poder discriminatorio mayor (*Diaz et al 1998 Doroudchi 2000*)

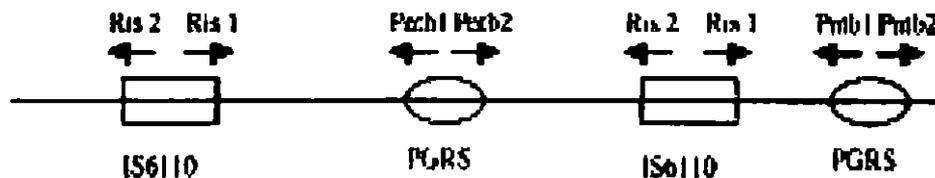
#### **1.4 UNIDAD REPETITIVA INTERCALADA DE MYCOBACTERIAS (MIRU) Y NUMEROS VARIABLES REPETITIVOS EN TANDEM (VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS VNTR)**

Son técnicas también basadas en PCR las cuales han mostrado resultados prometedores comparados con el tipado por IS6110. Estas técnicas se basan en la determinación de un locus polimórfico las cuales son independientes de técnicas que utilizan el tipado de la secuencia de inserción IS6110. Los MIRUS son un ejemplo de esos elementos, son una clase específica de VNTR que han sido identificados en 41 diferentes locus en el genoma de *M. tuberculosis* (*Suply et al 1997*). Cada uno comprende secuencias repetitivas cortas (menor de 100 pares de bases). El número de repeticiones en diferentes locus varía entre cepas diferentes. La amplificación por PCR de cada MIRU genera fragmentos de diferente tamaño en diferentes cepas. Si estos fragmentos son exactamente medidos el número de repeticiones de cada locus puede ser determinado. El análisis de 12 de los locus más hipervariables, resulta en un poder discriminativo cercano al tipado utilizando la secuencia de inserción IS6110 (*Mazars et al, 2001*)

## 2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

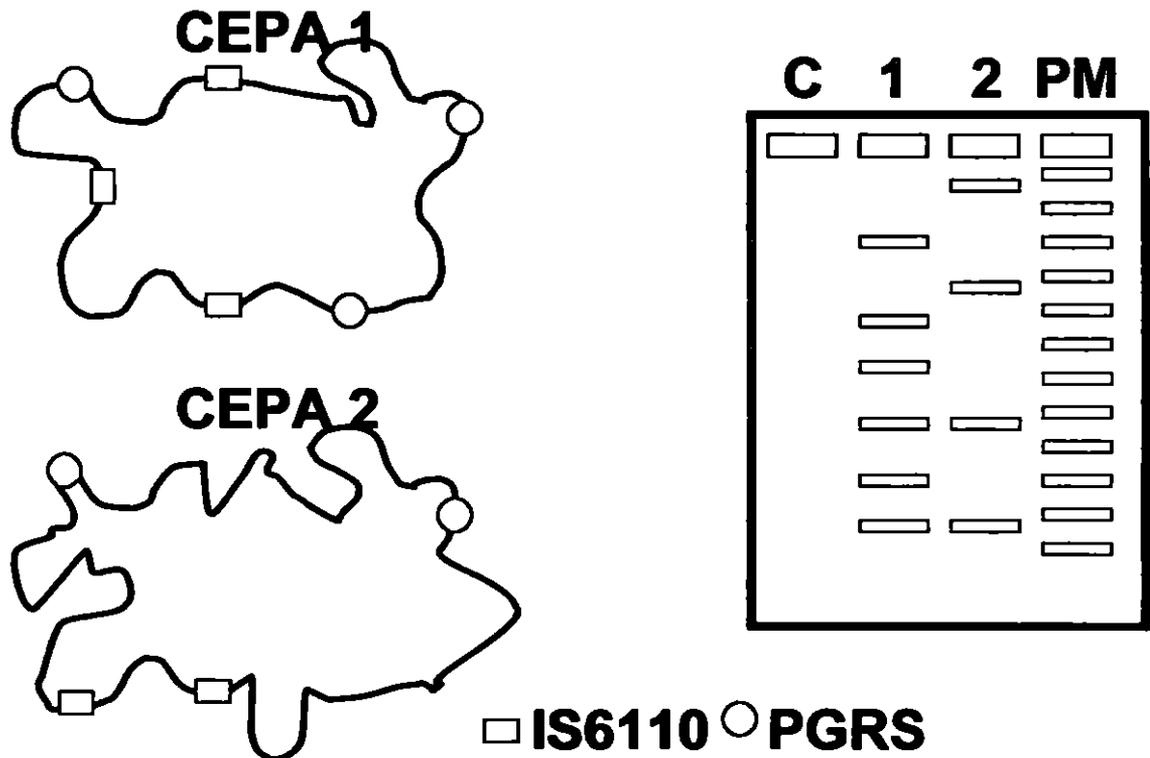
### 2.1 TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DE DOBLE ELEMENTO REPETITIVO (DRE-PCR)

En 1995 Friedman (*Friedman et al, 1995*) y sus colaboradores en Estados Unidos diseñaron 2 pares de cebadores (R<sub>is</sub> 1 R<sub>is</sub> 2 Pntb1 Pntb2) que flanquean los extremos terminales de dos elementos repetitivos (IS6110 y PGRS). R<sub>is</sub> 1 y R<sub>is</sub> 2 flanquean la región IS6110 y Pntb1 y Pntb2 flanquean la región PGRS. Los productos de PCR que se generan serán los comprendidos entre un elemento repetitivo y el siguiente, lo que permite obtener diferencias en el número y el tamaño de éstos fragmentos de DNA amplificado. Esta técnica fue denominada como Reacción en Cadena de la Polimerasa de Doble Elemento Repetitivo (DRE-PCR) (*Friedman et al, 1995*). La base racional de este procedimiento se basa en el hecho de que las distancias entre los elementos repetitivos y el número de copias IS6110 y PGRS varían de cepa en cepa. Estas variaciones permiten obtener fragmentos de DNA de diferente número y tamaño proporcionando patrones únicos en cada cepa de *M. tuberculosis* (*Friedman et al, 1995*).



*Primers R<sub>is 1</sub> R<sub>is 2</sub> Pntb1 Pntb2 flanqueando dos unidades repetitivas IS6110 y*

*PGRS*



*Cepa 1 y 2 mostrando que las distancias entre los elementos repetitivos y el número de copias IS6110 y PGRS varían de cepa en cepa obteniendo diferentes patrones de DRE PCR*

## 2.2 TÉCNICA DE ANÁLISIS DE POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Esta técnica basada en el análisis de la secuencia de inserción IS6110 es conocido como el método gold Standard para el tipado molecular del *Mycobacterium tuberculosis*. El análisis genético solo puede realizarse en pacientes con cultivo positivo confirmado y no en pacientes con una tuberculosis latente. Para ésta técnica el DNA del cultivo Micobacteriano es extraído y luego purificado. El DNA es

tratado con la enzima de restricción *PvuII* esta enzima reconoce una secuencia palindrómica específica de 6 nucleótidos en el DNA y lo cliva en cada ocurrencia de la secuencia. Los fragmentos de DNA resultantes son separados electroforéticamente en base a su tamaño se transfieren a una membrana de nylon e hibridizada con una sonda *IS6110* Esta sonda específicamente marca los fragmentos que contienen el elemento repetitivo *IS6110* La secuencia de inserción *IS6110* posee gran variabilidad con respecto al número de copias *IS6110* (0-25 copias) y su localización en el cromosoma del *M tuberculosis* El número de bandas resultantes corresponden al número de copias de *IS6110* y la localización de las bandas refleja el peso molecular de los fragmentos que contienen copias *IS6110* (Seidler et al 2004)

## CAPITULO III

### A MATERIALES Y METODOS

#### Muestra

Para el presente trabajo fueron colectadas 231 cepas de *M tuberculosis* sospechosas de multidrogoresistencia en la seccion de Micobacteriología del Laboratorio Central de Referencia en Salud Publica durante los años 2002 2004 procedentes de diversos Hospitales y Policlínicas del país Hospital Santo Tomás, Complejo Hospitalario Metropolitano Hospital Manuel Amador Guerrero de Colón, Policlínica Hugo Spadafora de Colón, Hospital Regional de Chepo Hospital Nicolás A Solano Hospital de Changuinola, Hospital Regional Rafael Hernández y Centros de Salud de la región de San Miguelito Cada cepa venía acompañada de un formulario (Ver anexo 2)

Las cepas fueron previamente identificadas como *M tuberculosis* mediante pruebas bioquímicas Pruebas de Niacina, Reducción de Nitratos y de Catalasa. Luego de la identificación dichas cepas fueron analizadas por el metodo de las proporciones de Canetti<sup>31</sup> para determinar la susceptibilidad a drogas Isoniazida, Rifampicina, Estreptomina, Etambutol y Acido Paraminosalicílico

Una vez hecho esto se seleccionaron aquellos aislados de *M. tuberculosis* resistentes al menos a Isoniazida y Rifampicina.

Los aislados fueron conservados a 70°C en leche descremada Skim milk 10%

Para realizar las pruebas de susceptibilidad y caracterización molecular se realizo una resiembra de las cepas en medio de Lowenstein Jensen para su crecimiento Una vez obtenidos los perfiles de susceptibilidad, los aislados de TB-MDR fueron caracterizados molecularmente por las técnicas de DRE-PCR y confirmados por RFLP



Cepa de *Mycobacterium tuberculosis* en medio de Lowenstein Jensen

#### **A. METODO DE LAS PROPORCIONES DE CANNETTI RIST Y GROSSET**

- 1 Antes de empezar a trabajar el tecnico realizó el lavado de las manos postura de la bata, protector respiratorio N 95 guantes de protección personal y encendido de la cámara de bioseguridad
- 2 Se preparó el área de trabajo colocando una fracción de papel toalla impregnado con lisol 10%
- 3 Con el asa metálica, se obtuvo el mayor numero posible de colonias desarrolladas en el tubo de cultivo de la cepa en estudio y se colocó en un tubo con perlas de vidrio al que previamente se le han adicionaron 5 gotas de agua destilada estéril
- 4 Una vez hecho esto con todos los aislados se agitó el tubo en un vórtex y se agregaron aproximadamente 4 ml de agua destilada estéril
- 5 Con una pipeta pasteur fueron retiradas unas gotas de la suspensión anterior y el etalón fue preparado conforme al patron, para lo cual se va agregando agua

destilada y agitando hasta que su opacidad se ajustara a la del patrón 0.1 de MacFarland. Esta es la llamada solución madre.

6. A partir de la suspensión madre se prepararon seis nuevas suspensiones en escala decimal utilizando seis tubos con 9 ml de agua destilada estéril rotulados de  $10^1$  a  $10^{-6}$ .
7. Las suspensiones decimales se hicieron tomando 1 ml de la suspensión madre y mezclándolo con los 9 ml de agua destilada del primer tubo, es decir el rotulado  $10^1$ .
8. Para obtener una suspensión homogénea, se agitó y con una nueva pipeta estéril se tomó 1 ml de la suspensión  $10^1$  y la cual fue añadida a los 9 ml de agua destilada del tubo  $10^2$  en la misma forma de antes. Se continuó así sucesivamente hasta preparar las seis diluciones.
9. Para la fidelidad de la prueba fue fundamental utilizar una pipeta para cada dilución y que los 9 ml de agua destilada fueran medidos exactamente y que se transfiriera exactamente 1 ml de suspensión de un tubo a otro.

## **B SIEMBRA DE LAS SUSPENSIONES BACILARES**

### **Material**

Una gradilla con Tubo con la suspensión  $10^3$

Tubo con la suspensión  $10^5$

Tubo con la suspensión  $10^{-6}$

- Tres series de tubos de medio de Lowenstein Jensen de la siguiente forma

- La primera serie rotulada  $10^3$  con dos tubos de medio de cultivo sin medicamento (tubos control) y un tubo de medio adicionado con cada medicamento a probar
- La segunda serie rotulada  $10^5$  igual a la anterior
- La tercera serie rotulada  $10^6$  sólo con dos tubos de medio sin medicamento o sea para control
- Un recipiente con fondo inclinado para colocar los tubos ya sembrados Se utilizaron para la siembra solo la de  $10^3$   $10^5$   $10^6$  tal como indica la tecnica

### **Procedimiento**

- 1 Se sembró 0.2 ml de la suspensión  $10^3$  en cada uno de los tubos correspondientes a la primera serie rotulada  $10^3$  Se procedio de la misma manera para las suspensiones  $10^5$  y  $10^6$
- 2 Para cada suspensión se utilizó una pipeta diferente de 1 ml graduada en centésimas para sembrar todos los tubos de la serie correspondiente
- 3 Una vez sembradas las tres series, se tomo cada tubo y manteniéndolo en posición horizontal fue rotado suavemente para que la suspensión sembrada se distribuyera sobre toda la superficie del medio
- 4 Se colocaron los tubos en posición horizontal en un cajón de fondo inclinado Se incubó a  $37^\circ\text{C}$  cuidando que los tubos no rotaran pues si esto sucedia las colonias se desarrollarían en el borde del medio y no podrían ser contadas
- 5 Se mantuvo floja la tapa del tubo durante las primeras 24 a 48 horas o hasta que se evaporara la parte líquida de la siembra, después de lo cual se ajustó fuertemente

### **Lectura e informe de los Resultados**

- 1 Las colonias fueron contadas cuidadosamente en los tubos de control en las series que fue posible hacerlo. La media de la suma de las colonias contadas en los dos tubos indica el número de bacilos sembrados por tubo.
- 2 En la misma serie se contaron las colonias desarrolladas en cada uno de los tubos con medicamento, lo que indicó el número de mutantes resistentes a cada uno. La relación entre el número de mutantes resistentes al fármaco y el número de bacilos sembrados (tubos control) multiplicada por 100 nos dio el porcentaje de resistencia a ese medicamento. La comparación de este porcentaje con la proporción crítica establecida para ese medicamento se determinó si la cepa era sensible o resistente.
- 3 Los resultados fueron leídos a los 28 días (4 semanas) y a los 40 días (6 semanas).
- 4 Los resultados se informaron indicando solamente si la cepa es sensible o resistente a cada uno de los medicamentos estudiados.
- 5 Con cada nuevo lote se efectuó una prueba completa de sensibilidad a la cepa estándar de *M. tuberculosis* H37Rv, la cual es sensible a todos los medicamentos utilizados.

Una vez hecho esto se procedió a conservar las cepas en leche descremada (Skim Milk/Difco) al 10% y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior caracterización molecular.

## **C CARACTERIZACIÓN MOLECULAR POR LA TECNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DE DOBLE ELEMENTO REPETITIVO (DRE PCR)**

Antes de iniciar los procedimientos moleculares se realizó una siembra de las cepas preservadas, en medio de Lowenstein Jensen para realizar la extracción del DNA directamente de la cepa ya crecida.

### **1 PREPARACION DE LA MUESTRA**

#### **Cuarto de Extracción de ADN**

#### **Protocolo de Extracción de ADN Genómico de Micobacterias**

- 1 1 Se transfirió una asada llena de Micobacterias a un tubo de Microcentrífuga que contenía 400  $\mu$ l de Tris (Hidroximetilaminometano) EDTA (ácido etilendiamintetracético) (TE) 1X
- 1 2 Se calentó por 20 minutos a 80°C para matar a las bacterias y enfrió a temperatura ambiente
- 1 3 Se agregó 50  $\mu$ l de lisozima (10 mg/ml) se agitó en vórtex e incubó a 37°C durante toda la noche
- 1 4 Se agregó 75  $\mu$ l de la mezcla de Sodio Dodecilo Sulfato (SDS) 10%, Proteinasa K (10 mg/ml) (proporción de 70  $\mu$ l de SDS por 5  $\mu$ l de Prot. K) se agitó en vórtex brevemente e incubó 10 minutos a 65°C
- 1 5 Se agregó 100  $\mu$ l de Cloruro de Sodio (NaCl) 5M

- 1 6 Se agregó 100  $\mu$ l de la solución de Cetil Trimethyl Ammonium Bromide/Cloruro de Sodio (CTAB/NaCl) la cual fue previamente calentada a 65°C se agito en vórtex hasta que el liquido contenido se tomara blanco (lechoso) Se Incubó 10 min a 65 C
- 1 7 Se agrego un volumen de aproximadamente 750  $\mu$ l de Coloroformo/Alcohol Isoamílico se agitó en vórtex por al menos 10 segundos y centrifugó a temperatura ambiente por al menos 5 minutos a 12 000 g
- 1 8 El sobrenadante acuoso fue transferido en cantidades de 180  $\mu$ l a tubos de microcentrifuga nuevos usando una micropipeta P 200
- 1 9 Se agregaron 0 6 volúmenes (450  $\mu$ l) de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos
- 1 10 Se Coloco 30 min a -20°C
- 1 11 Se realizo una centrifugación de 15 minutos a temperatura ambiente en una microcentrifuga 12 000g
- 1 12 Se descarto la mayoría del sobrenadante dejando alrededor de 20  $\mu$ l sobre el pellet (precipitado)
- 1 13 Se agregó 1 ml de etanol frio al 70% y se giró unas cuantas veces de arriba hacia abajo
- 1 14 Se realizo una centrifugación de 5 minutos a temperatura ambiente en una microcentrifuga. Se descartó el sobrenadante y se dejaron alrededor de 20  $\mu$ l encima del pellet
- 1 15 Se realizo una ultima centrifugación de 1 min en una microcentrifuga y se descartaron cuidadosamente los ultimos 20  $\mu$ l de sobrenadante que quedaron justo

encima del pellet usando una micropipeta P 20 Todas las trazas de etanol fueron removidas

1 16 Se dejo secar el pellet a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos

1 17 Finalmente se resuspendió el pellet en 20  $\mu$ l de buffer TE 1X

1 18 Para una rápida estimación de la concentración de ADN se midió por espectrofotometria (longitud de onda 260 nm) cada una de las muestras extraídas

## 2 PREPARACION DE LA MEZCLA MADRE PARA PCR Y DE LOS TUBOS DE REACCION

### Cuarto de Pre PCR

#### Reactivos

PCR Master Mix 2X (*Taq* 50 UI/ml Dinucleóticos (dNTPs 1 6 mM) Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$  3 mM pH = 8 5)

#### Cebadores

R1s1 5 GGC TGA GGT CTC AGA TCA G 3

R1s2 5 ACC CCA TCC TTT CCA AGA AC 3

Pntb1 5 CCG TTG CCG TAC AGC TG 3

Pntb2 5 CCT AGC CGA ACC CTT TG 3

$MgCl_2$  (25 mM)

Agua bidestilada estéril libre de nucleasas

Control positivo (cepa de referencia de *M tuberculosis* H37 Rv con un patron de DRE

PCR consistente de al menos 3 fragmentos)

- 2.1 Se calculó la cantidad de Master Mix de PCR que era necesaria para el número deseado de reacciones cada una contenía 25  $\mu$ l de la mezcla.
- 2.2 Los tubos apropiados para el termociclador fueron marcados con sus números correspondientes
- 2.3 Se descongelaron las alícuotas de cada reactivo. Se mezclaron muy bien con vórtex y se bajó el líquido con un golpe de centrifuga (*spin down*) procurando mantener todos los ingredientes y tubos sobre hielo
- 2.4 En el cuarto de Pre-PCR usando pipetas exclusivas, se preparó la mezcla de PCR con todos los ingredientes. Se mezcló bien utilizando un agitador vórtex
- 2.5 Se distribuyó 20  $\mu$ l de la mezcla de PCR en cada tubo rotulado
- 2.6 Finalmente se agregó 5  $\mu$ l de  $d_6$ H<sub>2</sub>O para preparar el control negativo

<b>Reactivo</b>	<b>Vol/tubo <math>\mu</math>l</b>
PCR Master Mix 2x	12.5
Primer 1 (Ris 1)	1.25
Primer 2 (Ris 2)	1.25
Primer 3 (Pntb 1)	1.25
Primer 4 (Pntb 2)	1.25
MgCl <sub>2</sub>	1.0
DMSO 6%	1.5
<b>Volumen Mix</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>
<b>Volumen Muestra</b>	<b>5 <math>\mu</math>l</b>
<b>Volumen /Tubo</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

### 3 ADICION DE LA MUESTRA

#### Cuarto de Extraccion de ADN

- 1 En el Cuarto de Extracción de ADN usando una pipeta P20 se agrego 5  $\mu$ l de las muestras y controles apropiados Se utilizo una punta nueva para cada muestra Para el control negativo se utilizó agua destilada en reemplazo de la muestra.

### 4 AMPLIFICACION DE LA MUESTRA

#### Cuarto de Post PCR

#### Programa de Amplificación

95 C	10 min	1 ciclo	Desnaturalización inicial
95 C	30 seg		
ramp	0 7° x segundo (1 minuto)		
52 C	40 seg	30 ciclos	Amplificación
72 C	50 seg		
72 C	5 min	1 ciclo	Extensión final

### D ANALISIS DEL PRODUCTO

#### CUARTO de Post PCR

- 1 Para cada gel, se preparó una solución de 1 5% agarosa en Tris Borato EDTA (TBE) 1X y se calentó hasta disolver la agarosa.

- 2 Se dejó enfriar la solución hasta aproximadamente 55°C. Luego se adicionó el bromuro de etidio (10 mg/ml) a una dilución de 1/20 000 (concentración final 0.5 ug/ml). Se preparó el gel vertiendo la solución en el molde, evitando la formación de burbujas.
- 3 Se preparó buffer de TBE 1X para el gel con Bromuro de Etidio a una concentración final de 0.5 ug/ml.
- 4 Para una mayor organización del trabajo se preparó un esquema mostrando el orden de las muestras en el gel.
- 5 Se prepararon las muestras para el gel en el orden estipulado empleando los siguientes volúmenes:
  - 20  $\mu$ l del producto de ADN
  - 3.5  $\mu$ l del buffer de carga
  - 3.5  $\mu$ l del Marcador de Peso molecular
- 6 Se colocó el gel en la cámara de electroforesis cubriéndolo con TBE 1X.
- 7 Se aplicó el volumen total de cada muestra al gel según el orden predeterminado.
- 8 Se corrió el gel a 50 voltios por 5 a 10 minutos y luego el resto de la corrida a ~100 V.
- 9 Finalmente se tomaron fotografías de los respectivos geles usando el transiluminador de luz ultravioleta con película Polaroid 667.

### **Análisis de los Perfiles de PCR**

EL análisis de PCR fue realizado comparando visualmente las bandas obtenidas por su tamaño y Peso molecular unas con otras.

## **E TECNICA DE POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)**

- 1 Una vez extraído el ADN (Ver Protocolo de extracción de ADN Genómico de Micobacterias) Se procedió a realizar la digestión genómica del DNA con la enzima de restricción *PvuII* Agregando a cada muestra la cantidad de enzima, buffer y agua en las siguientes cantidades Volumen calculado para 40 muestras

<b>Reactivo</b>	<b>Vol. en <math>\mu</math>l</b>	<b>Vol. en <math>\mu</math>l</b>
<i>Pvu II</i>	1	40
Buffer 10X	2	80
Agua Esteril	7	280

- 2 Una vez hecho esto se preparó el gel de agarosa 0.8% en Buffer TBE (1X) añadiendo 350ml de Buffer y 2.8g de agarosa para un gel de 24 pocillos) Se utilizó el mismo gel para llenar la cámara y preparar el agar
- 3 Una vez armada la cámara, se vertió el gel y se esperó el tiempo necesario para su solidificación
- 4 Mientras se esperaba el tiempo de solidificación del gel se procedió a preparar el ADN digerido añadiendo a cada tubo de ADN 3  $\mu$ l del Buffer de corrida, el cual se preparó de la siguiente manera. (Volumen para corrida de 24 muestras)

<b>Reactivo</b>	<b>Vol. en <math>\mu l</math></b>
Lambda Hind III	8 $\mu l$
PhiX174-HaeII	25 $\mu l$
Buffer de muestra 5X	40 $\mu l$
TE 1X	37 $\mu l$

- 5 Una vez solidificado el gel y preparado el ADN para la corrida se prepararon los pozos de corrida de la siguiente manera. Los pozos 1 y 24 se dejan vacíos las Lineas 2 y 23 fueron destinados para el control H37Rv por lo que corrimos solo 20 muestras por gel
- 6 Una vez cargadas las muestras, se procedió a correr el gel a un voltaje constante de 100v por los primeros 10 minutos para luego colocarlo a 60v por 1000v/hr Esta corrida se deja toda la noche (Aproximadamente 16h)
- 7 Una vez terminada la corrida, se procedió a tomar el gel y transferirlo a un plato grande sin sacarlo del soporte
- 8 Una vez hecho esto se procedió a irradiar el gel con el transiluminador de luz UV por 5 minutos para romper el ADN
- 9 Se enjuagó el gel en HCl 0.25M por 10 minutos descartando posteriormente el HCl luego en 1 litro de NaOH 0.4M doblemente por 20 minutos cada uno
- 10 El DNA se expuso a la luz ultravioleta con HCl y NaOH para romper el DNA en fragmentos mas pequeños El tratamiento con ácido parcialmente depura el DNA y éstos sitios son clivados durante el tratamiento con el álcali resultando en

fragmentos de DNA más pequeños

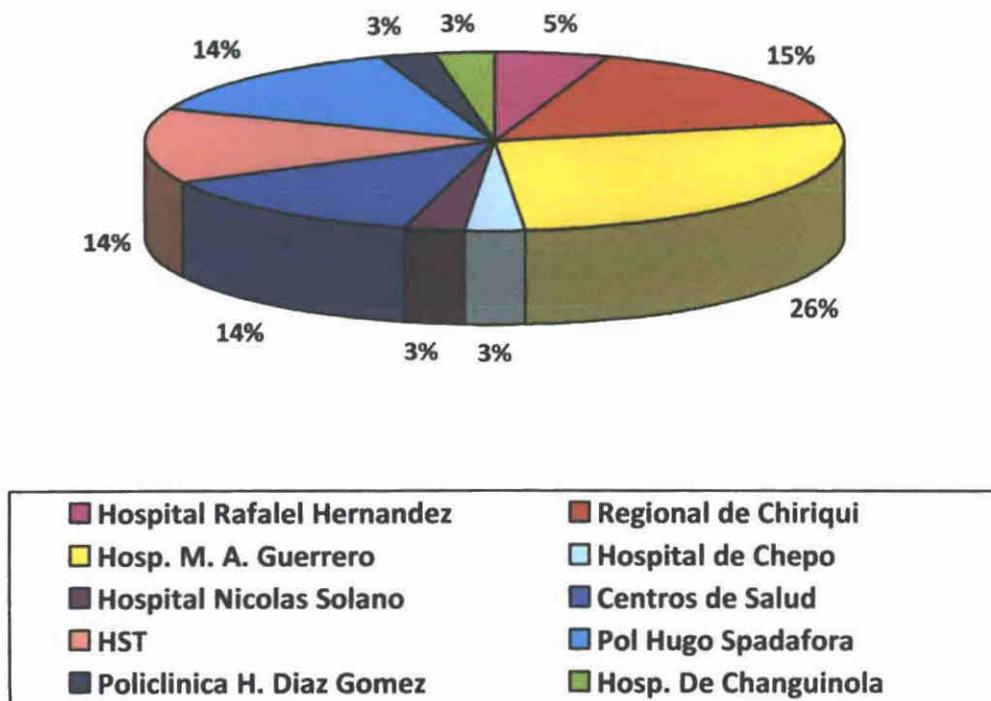
- 11 Mientras el gel se enjuagaba en NaOH se procedió a preparar la cámara de blotting remojando un poco con agua destilada para humedecer la cámara. Se cortaron pedazos de papel filtro (20mm x 20mm) humedeciéndolas un poco con agua destilada.
- 12 Se colocó el gel encima del papel filtro cuidadosamente. Con una pipeta P20 con cuidado se realizaron 2 orificios en el gel en la parte superior izquierda y derecha agregándole marcador en cada orificio
- 13 Se cortó una pieza de Membrana de Nylon Hybond N+ colocando en una esquina de la membrana la fecha de la corrida y el nombre con un lápiz. Se colocó encima del gel cuidadosamente. Colocándole luego otra pieza de papel filtro
- 14 Con cuidado de no mover el gel se colocó el resto de los papeles cortados y el papel toalla, el NaOH 0.4M fue vertido en los extremos de la cámara de manera que el papel filtro más largo se impregnara con el humedeciéndolo así la base del gel. Se colocó un peso encima para facilitar la transferencia. Se aprecia como el gel va disminuyendo su espesor a medida que pasa el tiempo
- 15 Una vez culminada la transferencia, se procedió a enjuagar la membrana con 400 ml de SSC 5X por 15 minutos (100 ml de SSC 20X + 300 ml H<sub>2</sub>O)
- 16 Una vez hecho esto se cortó una bolsa y se sellaron los extremos para la membrana con el DNA hacia arriba.
- 17 Se prepararon 40 ml de la solución de hibridización y se colocó dentro de la bolsa.
- 18 Se removieron las burbujas se selló la bolsa y se procedió a prehibridar por 30 min a 42 C

- 19 Mientras transcurria la prehibridación se desnaturalizo 5  $\mu$ l de la sonda IS6110 en un volumen de 15  $\mu$ l de agua a 80-90 C por 5 minutos y luego se colocó en hielo por otros 5 minutos
- 20 Una vez hecho esto se añadieron 20  $\mu$ l de mezcla de unión (labeling mix) se le dio vórtex y posteriormente se añadieron 20  $\mu$ l de glutaraldeido Se le dio vórtex nuevamente y se incubó a 37°C por 20 minutos
- 21 Se corta un extremo de la bolsa y se añade la sonda (60  $\mu$ l) teniendo cuidado de no colocar la sonda directamente en la membrana, sino en un extremo de la solución
- 22 Se removieron las burbujas se selló la bolsa y luego se hibridizó por toda la noche a 42 C
- 23 Una vez transcurrido el tiempo necesario se lavó dos veces la membrana con buffer de lavado (0.4% SDS/0.5XSSC) a 55°C por 10 minutos cada una en un baño con una vasija tapada. Se le añaden 500 ml a cada una (25ml de SSC20X 40ml de SDS 10% y 935ml de H<sub>2</sub>O)
- 24 Se lavó la membrana dos veces nuevamente en 2XSSC a temperatura ambiente 5 min (100 ml de SSCX 20X, 900ml de H<sub>2</sub>O)
- 25 Se secó la membrana y luego se procedió a realizar el revelado de los films

## B. RESULTADOS:

Desde Enero del año 2002 a diciembre del año 2004 fueron recolectados 231 aislados de *M. tuberculosis* de distintos hospitales y centros de salud de la República de Panamá: Hospital Santo Tomás, Complejo Hospitalario Metropolitano, Hospital Manuel Amador Guerrero de Colón, Policlínica Hugo Spadafora de Colón, Hospital Regional de Chepo, Hospital Nicolás A. Solano, Hospital de Changuinola, Hospital Regional Rafael Hernández y Centros de Salud de la región de San Miguelito.

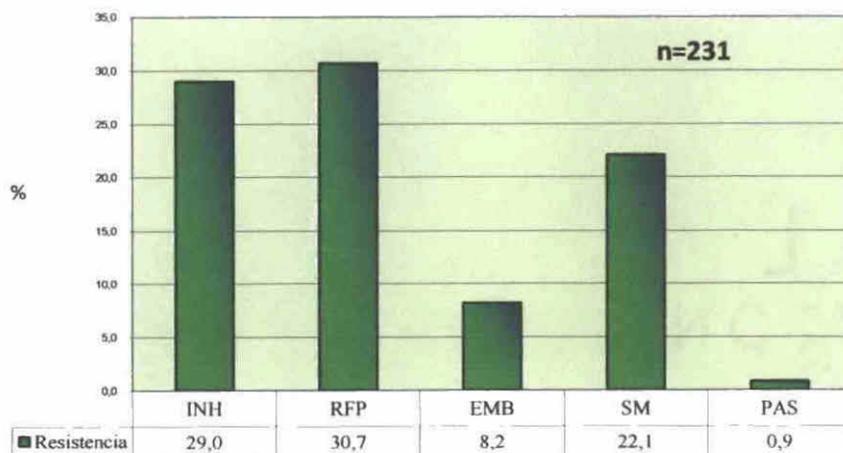
**Fig 1. Distribución de los aislados de *M. tuberculosis* según Instalación de Salud**



A todos los aislados se les realizó la prueba de sensibilidad para determinar su resistencia a los fármacos antituberculosos: Isoniazida (INH), Rifampicina (RFP), Ethambutol (EMB), Estreptomina (Sm) y Acido Paraminosalicílico (PAS).

El perfil de resistencia encontrado entre los pacientes con TB-MDR fue INH (29.0%), RFP (30.7%), Sm (22.1%), EMB (8.2%) y PAS (0.9%). (Figura 2).

**Fig. 2. Análisis de las pruebas de resistencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aislados en Panama. 2002-2004.**



INH: Isoniazida, RFP: Rifampicina, EMB: Ethambutol, SM: Streptomina, PSA: Acido Paraminosalicílico.

La Figura 2 muestra que de los 231 aislados, el 30.7% (71) de las cepas resultaron resistentes a Rifampicina.

El análisis detallado de los perfiles de resistencia, reveló que el 16% (37) eran resistentes al menos a INH y RFP (MDR), y que el 5.4% (2) de los aislados eran resistentes a todas las drogas empleadas en el análisis de resistencia in vitro. (cuadro 1)

El perfil de resistencia encontrado con mayor frecuencia entre los 37 pacientes MDR fue el de INH,RFP,SM.

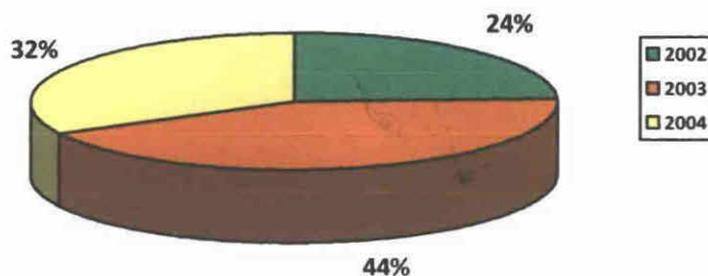
**Cuadro 1. Perfil de resistencia de aislados de *Mycobacterium tuberculosis* Multidrogoresistente en Panamá.**

Antifímico	Número de aislados	% Resistencia
INH, RFP	12	32.4
INH, RFP, SM	15	40.5
INH, RFP, EMB	0	0
INH, RFP, PAS	0	0
INH,RFP,SM, PAS	0	0
INH, RFP, SM, EMB	8	21,6
INH, RFP, SM, EMB, PAS	2	5.4

INH: Isoniazida, RFP: Rifampicina, EMB: Etambutol, SM: Streptomycin, PAS: Acido Paraminosalisílico

De los pacientes con multidrogoresistencia seleccionados, 9 fueron identificados en el año 2002, 16 en el año 2003 y 12 en el año 2004. (Figura 3)

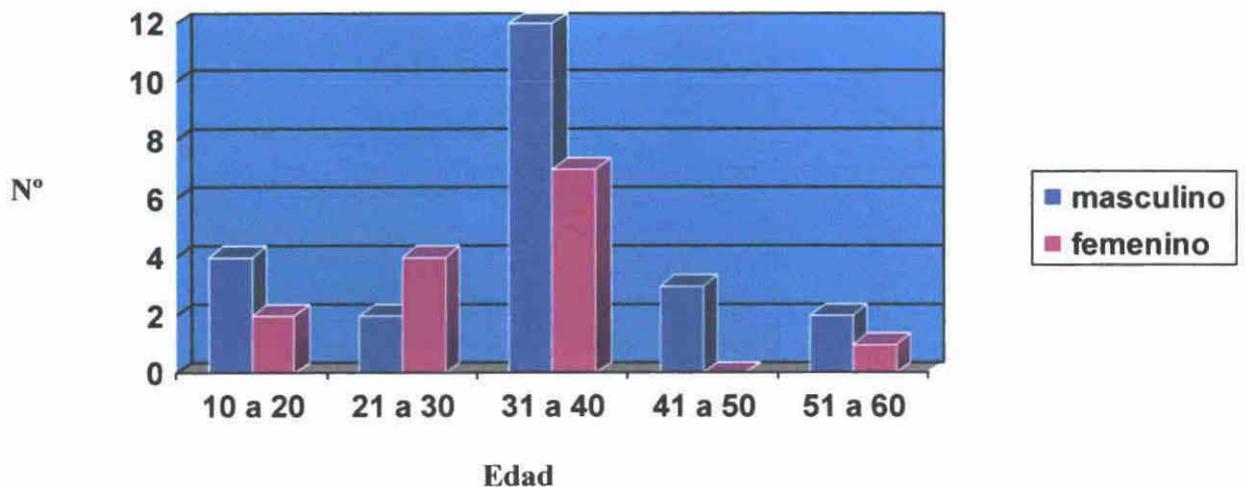
**Fig. 3. Porcentaje de pacientes con TB-MDR según año de recolección.**



El análisis de los factores de riesgo entre los 37 pacientes con TB-MDR, demostró que el 10.8% (4) de los pacientes eran VIH positivos, 24.3% (9) eran drogadictos y 89% (33) eran pacientes con historia de tratamiento previo.

Los casos de TB-MDR fueron más frecuentes entre pacientes del sexo masculino 64.9% (24) que entre los pacientes del sexo femenino 10.8% (13). El 48.6% (18) estaban en el grupo de edad de 31 a 40 años. (Figura 4).

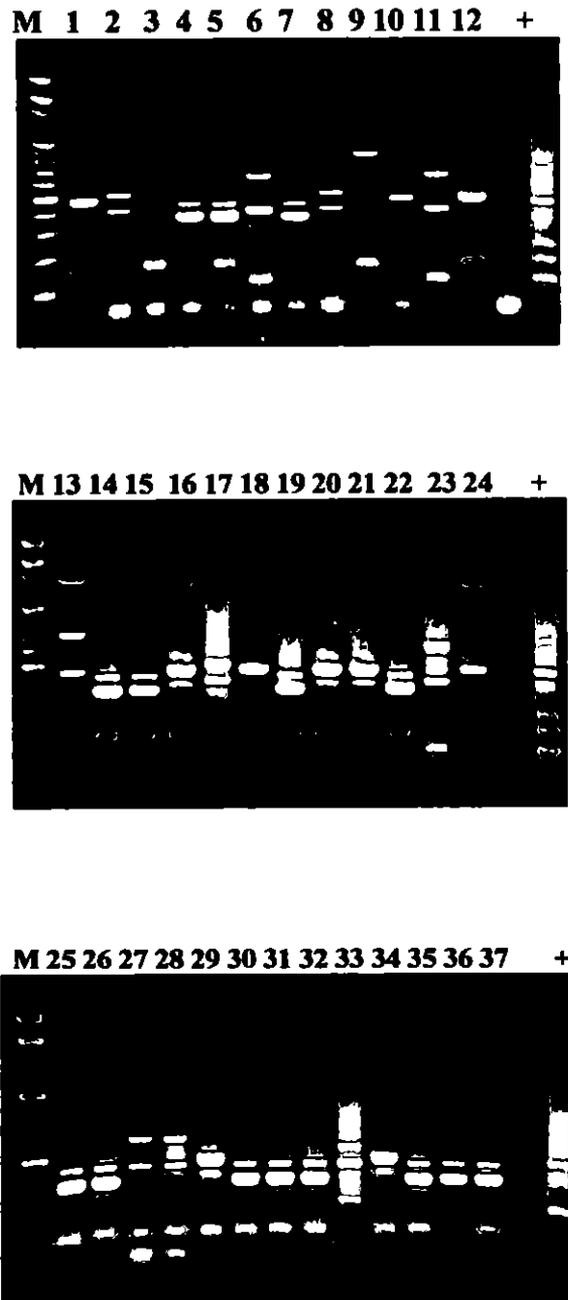
**Fig. 4 Distribución de los pacientes con TB-MDR según grupo de edad.**



De acuerdo a nuestro estudio, los pacientes con TB-MDR de Panamá proceden de las siguientes regiones de salud: Colón (37.8%), Chiriquí (21.6%), Metropolitana (18.9%), Panamá Este (5.4%), Bocas del Toro (2.7%), Panamá Oeste (2.7%), San Miguelito (2.7%) y Veraguas (2.7%).

Mediante la caracterización molecular de los 37 aislados de TB-MDR, fueron obtenidos quince diferentes patrones de DRE-PCR agrupados en 6 grupos o clusters de 2-8 bandas, cada uno de los clusters se describen a continuación. (Figura 5)

**Fig 5 Patrones moleculares encontrados por la técnica de DRE-PCR**



**Figura 5** Patrones de DRE PCR de 37 aislados de TB MDR mostrando visualmente patrones similares o iguales. Los cluster presentan de 2-8 bandas. **Cluster A** Aislado N 1 **Cluster A1** 12 16 18 20 21 29 34 **Cluster A2** 10 A3 24 **Cluster B** 2 8 **Cluster C** 3 **Cluster C1** 9 **Cluster D** 4 7 14 15 19 22 25 26 30 31 32 35 36 37 **Cluster D1** 5 **Cluster E** 6 11 **Cluster E1** 13 **Cluster F** 27 28

**Cluster A** 10 de las 37 cepas (27.02%) caracterizadas molecularmente presentaron este patrón de 4-6 bandas. Dentro de este cluster 2 aislados fueron clasificados como A y A2 pues presentaron una diferencia de 1 banda entre ellas. El 60% de las cepas dentro de este cluster provienen de la región de Chiriquí.

**Cluster B** 2 de los 37 aislados (5.4%) presentaron este patrón idéntico de 2 bandas. Ambas cepas pertenecen a la región de Colón.

**Cluster C** 2 de los 37 aislados (5.4%) presentaron este patrón de 6-9 bandas. Ambas están relacionadas molecularmente pero con diferencia en 3 bandas extra en una de las cepas.

**Cluster D** Este cluster representa el 40.5% (15/37) de los casos agrupados. Uno de los aislados presentó diferencia de una banda extra. Nos dimos cuenta, que el 66.7% de los aislados pertenecientes a este grupo o cluster pertenecen a la Región de Colón. Dos grupos por separado presentaron vínculos epidemiológicos. Los aislados 14 y 19 eran tía y sobrina mientras que los aislados 15 y 31 son tío y sobrino.

**Cluster E** Tres de los treinta y siete aislados (8.1%) presentaron este patrón de 5-7 bandas. Una de los aislados presentó dos bandas de diferencia.

**Cluster F** 2 de las 37 cepas (5.4%) presentaron este patrón de 7 bandas. Se encontró en las regiones Metropolitana y Chiriquí.

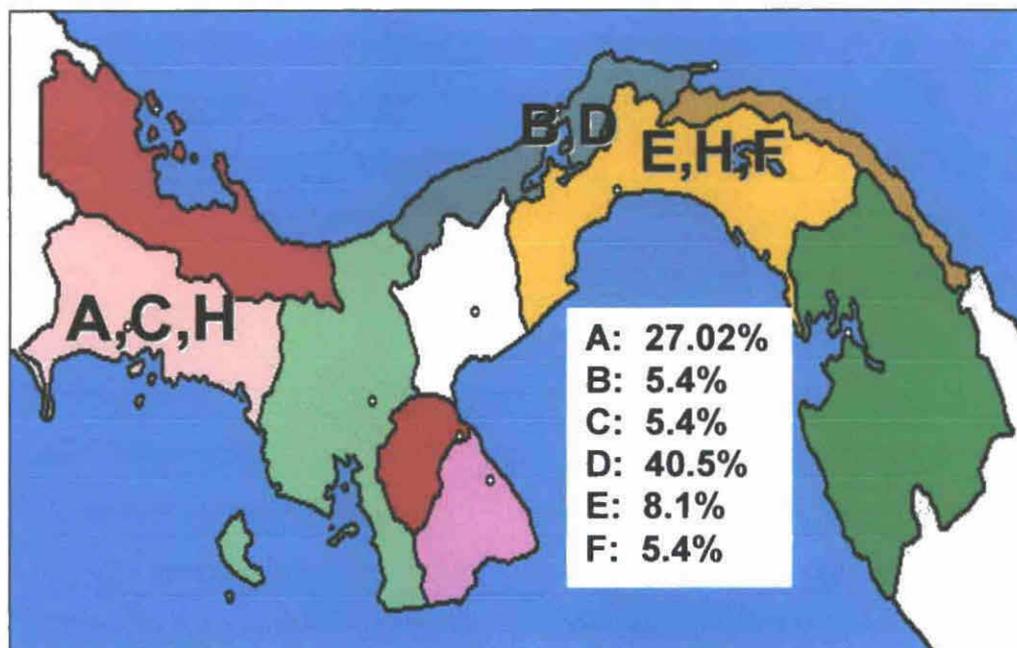
**Patrones unicos que no pertenecen a un cluster** Solo 3 aislados (8 2%) presentaron patrones unicos de cinco a ocho bandas Estas cepas proceden de las regiones de Chiriqui Metropolitana y Veraguas El 91 8% (34) de los aislados fue clasificado como miembro de un cluster (Cuadro 2)

**Cuadro 2 Distribución de los Cluster y Patrones de DRE PCR segun las regiones de salud en Panama.**

Cluster de DRE-PCR	N de Aislados	Region de Salud	Nº de Muestra
A	1	Chiriquí	1
A1	4	Chiriquí	12,20,21,29
	1	Changuinola	34
	1	Colón	16
	1	Metropolitana	18
A2	1	Pama Oeste	10
A3	1	Chiriquí	24
B	2	Colón	2,8
C	1	Chiriqui	3
C1	1	Chiriquí	9
D	11	Colon	4 7 14,15,19,22 25,26,31,32,37
	2	Metropolitana	35,36
	1	San Miguelito	30
D1	1	Colon	5
E	2	Panama Este	6,11
E1	1	San Miguelito	13
F	2	Metropolitana y Chiriquí	27,28

El cuadro 2 muestra la distribucion de los clusters por region de salud Los mas frecuentes fueron los clusters D y A el cluster D en la region de Colón (15) mientras que el patron del cluster A en Chiriquí (10) \*Los aislados 17 23 y 33 presentaron patrones unicos por lo que no pertenecen a ningun cluster

**Fig.6. Distribución de los clusters según región de salud.**



La Figura 6 muestra la distribución geográfica de los clusters en Panamá. Se aprecian las regiones con predominio del cluster D en Colón y el cluster A en la región de Chiriquí.

Los patrones obtenidos por DRE-PCR fueron comparados con los patrones de *IS6110* RFLP (cuadro 3). Nuestro estudio mostró que el 94.6% (35) de las cepas presentaron patrones agrupados por *IS6110*-RFLP, mientras que el 91.8% (34) resultaron miembros de un cluster por DRE-PCR. Entre los patrones moleculares obtenidos por DRE-PCR, se observó concordancia en 34 de los 37 aislados confirmados por RFLP. Los resultados discordantes correspondieron al cluster A donde un miembro clasificado como A1 por DRE-PCR, fue agrupado como A por RFLP; adicionalmente dos aislados del cluster A, fueron identificados como miembros de un nuevo cluster por RFLP. Por otro lado, el

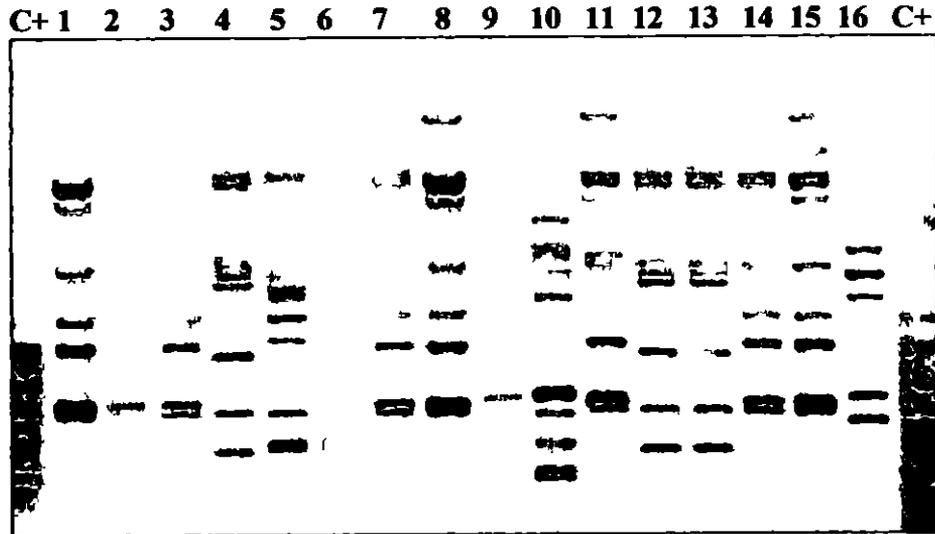
patrón unico clasificado como Cluster G por DRE PCR fue identificado como miembro del cluster E por *IS6110* RFLP

**Cuadro 3 Comparación de patrones de DRE-PCR y de *IS6110* RFLP en Panamá**

Muestra N°	DRE-PCR Cluster	<i>IS6110</i> -RFLP	Muestra N°	DRE-PCR Cluster	<i>IS6110</i> -RFLP
1	A	A	19	D	D
12	A1	A	22	D	D
16	A1	A	25	D	D
18	A1	A	26	D	D
20	A1	A	30	D	D
21	A1	A	31	D	D
29	A1	G	32	D	D
34	A1	A	35	D	D
10	A2	A	36	D	D
24	A3	G	37	D	D
2	B	B	5	D1	D1
8	B	B	6	E	E
3	C	C	11	E	E
9	C1	C	13	E1	E1
4	D	D	27	H	H
7	D	D	28	H	H1
14	D	D	17	F	F
15	D	D	23	G	E
			33	I	I

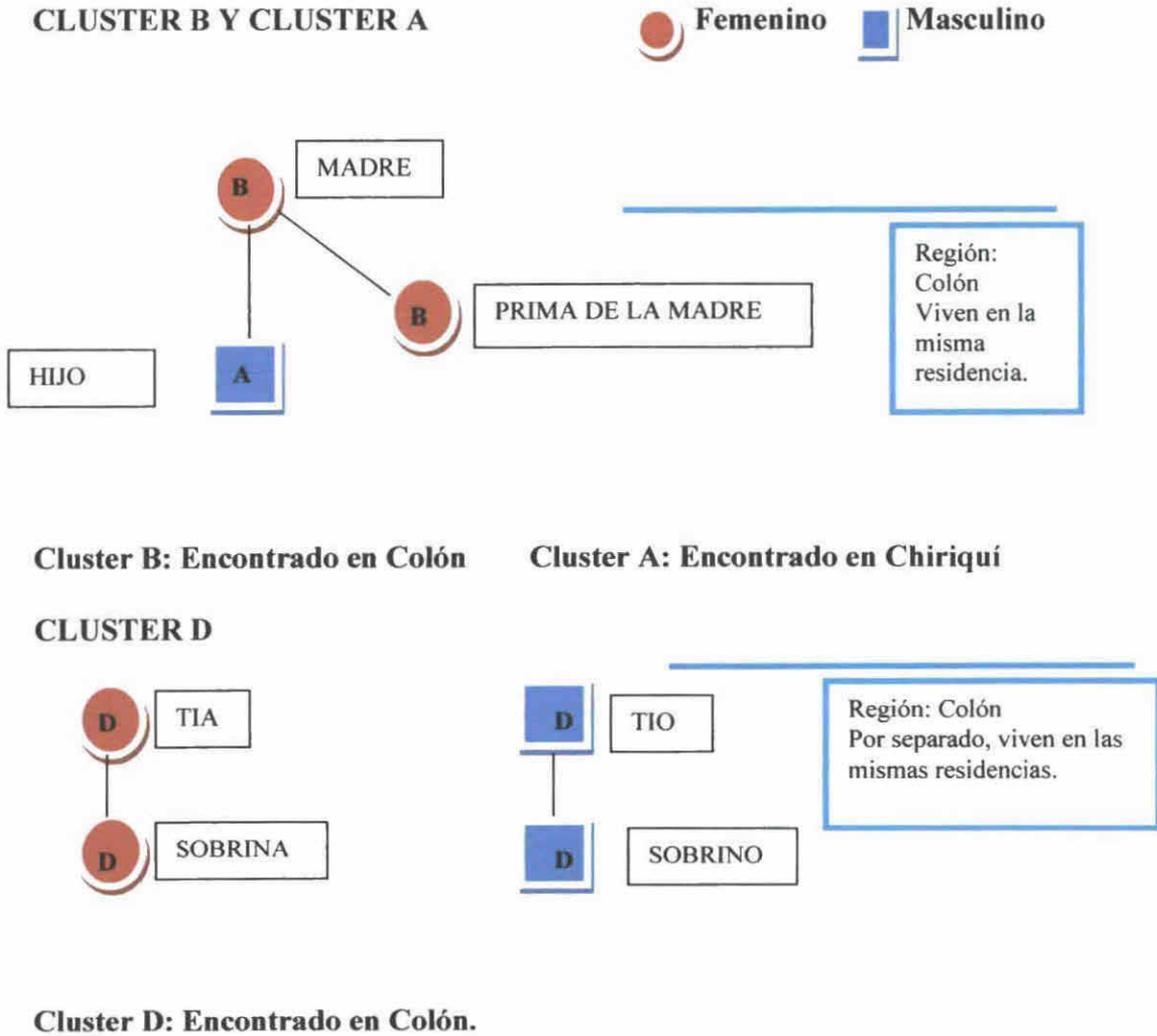
El cuadro 3 muestra la concordancia obtenida por la técnica de DRE PCR y el *IS6110* RFLP Las cepas fueron ordenadas de acuerdo al cluster correspondiente algunas de ellas solo difieren en una banda

**Fig 7 Patrones moleculares encontrados por la técnica de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)**



La figura 7 muestra los patrones de RFLP de 16 de de los aislados mostrando visualmente patrones similares o idénticos confirmando los resultados obtenidos por DRE PCR

La Figura 8 muestra los vínculos familiares existentes entre miembros de algunos clusters.



## C DISCUSIÓN

En Panamá al igual que en otros países latinoamericanos la tuberculosis constituye un problema serio de salud pública. Su mayor impacto se observa en la emergencia de casos de TB MDR donde la demora en el diagnóstico y el reconocimiento de la resistencia a una o a múltiples drogas del tratamiento se constituyen como uno de los factores que contribuyen a la aparición de nuevos casos de TB MDR, razón por la cual lo seleccionamos como tema de estudio.

De acuerdo a los datos epidemiológicos disponibles el 29.7% de los pacientes en este estudio ingresaron al PNCTB en la década de los 90tas periodo durante el cual no se había establecido la estrategia TAES en la República de Panamá. El tratamiento supervisado se llevaba solo en algunas áreas y en la mayoría de las regiones de salud se daba el tratamiento auto administrado. En el año 2000 gracias a los esfuerzos de las autoridades de salud e intervención de organismos internacionales se incorporaron las primeras regiones de salud al TAES (Ver adelante antecedentes).

La prueba de sensibilidad a los fármacos antituberculosos estandarizada según normas internacionales es una prueba que se realiza únicamente en el laboratorio Central de Referencia en Salud Pública del Instituto Comemorativo Gorgas. En consecuencia, la información sobre el perfil de resistencia de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en Panamá es escasa. Las tasas de resistencia mostradas en este estudio (16% de multidrogoresistencia) plantean la necesidad de desarrollar estudios que permitan determinar a nivel nacional la tasa real de resistencia primaria y secundaria que existe

actualmente en Panamá así como también la necesidad de realizar la prueba de sensibilidad en otras instalaciones de salud

Desde 1973 fecha en que comenzaron a aparecer los primeros casos de TB MDR en Panamá y en los países de Latinoamérica, la tuberculosis ha sido motivo de preocupación mundial. Esto llevó a la OMS a declarar la tuberculosis como una enfermedad de emergencia a nivel mundial y con ello a intensificar las medidas de control. Sin embargo en los últimos años ha recibido especial atención por los brotes de TB MDR que han ocurrido en algunas partes del mundo en pacientes con VIH (*Beck-Sague et al 1992 Edlin et al 1992 Fischl et al 1992 McGowan Jr 1995*)

La infección con el virus de la inmunodeficiencia humana como factor de riesgo para TB MDR ha sido discutida por muchos años. (*Chest et al 2005 Spellman et al 1998*) Weltman y colaboradores asocian la infección por el virus como factor de riesgo para adquirir una TB MDR sin embargo otros autores no consideran que la infección por el VIH sea un factor que facilite la adquisición o desarrollo de una TB MDR (*Wilkinson et al 1996 Boudville et al 1997*) En nuestro estudio encontramos que la infección por el VIH es un factor de riesgo importante para la adquisición de una TB MDR ya que el 10.6 % de los pacientes estudiados tenían la doble infección. El paciente con la doble infección VIH TB es un paciente que requiere continua supervisión sobretodo por el número de reacciones adversas, intolerancias e interacciones medicamentosas que puede tener. Al ser tratado por TB puede incurrir en una complicación al paciente por las interacciones farmacológicas en especial la Rifampicina con los inhibidores de proteasas. Otro problema con estos pacientes es la mayor probabilidad de recaídas que se

presentarán a medida que disminuyen sus defensas y con ello la mayor posibilidad de desarrollar una TB MDR (*Camirero 2003*)

Nuestro estudio al igual que otros que se han realizado en pacientes con doble infección TB MDR VIH demuestran que la Tuberculosis multidrogoresistente no es un problema que afecta sólo a pacientes inmunosuprimidos. (*Palmera D et al 2003*)

Un hallazgo importante de nuestro estudio fue que casi el 25% de los pacientes con TB MDR consumían alguna droga, porcentaje mayor al publicado por algunos autores como factor de riesgo para adquirir una TB MDR (*Maltez et al 2003*)

El paciente drogadicto resulta de manejo difícil para el personal de salud porque es inconsistente en la toma de los medicamentos y lo abandona fácilmente tiene pobre asistencia social y baja adherencia al tratamiento (*Maltez et al 2003*) Las razones para la pobre adherencia a los programas de control no son sólo multifacéticas y complejas sino que dependen de las características particulares de los pacientes el status económico y social que en conjunto influyen sobre todas las actividades de prevención y control de la Tuberculosis (*Sumartojo et al 1993*)

El factor de riesgo más importante y en el que concordamos con estudios previos realizados (*Perkins et al 2000 Weltman 1994*) es que el 89.2% de los pacientes fueron antes tratados (AT) En nuestro estudio no tuvimos acceso a la información completa sobre los ciclos de tratamiento administrados a los pacientes o su cumplimiento a las normas del PNCTB sin embargo se considera que solo el hecho de que un paciente haya recibido previamente tratamiento para TB incluso si cumple con el esquema completo representa un riesgo para desarrollar una TB MDR (*Weltman 1994*)

El 21.6% de los pacientes con TB MDR que formaron parte del estudio fallecieron lo que indica una alta letalidad y confirma la grave situación de salud que enfrentan éstos pacientes porque el tratamiento es prolongado y puede oscilar entre 12 a 24 meses con drogas más costosas tóxicas y menos efectivas que la Rifampicina y la Isoniazida del esquema inicial

En cuanto a la distribución geográfica de los pacientes estudiados con TB MDR el 37.8% pertenece a Colón región donde existe una alta incidencia de la tuberculosis en Panama (*PNCTB Panama, 2004*) Dato que indica que existe un problema real y preocupante de salud en ésta región de la Republica. La provincia de Chiriqui también presenta tasas elevadas de tuberculosis sobretodo por la población migratoria indígena de la comarca Ngobe Buglé que colinda con ellos

La caracterización molecular de los aislados, utilizando la técnica de DRE-PCR permitió que fueran agrupados el 91.8% de los aislados en 6 clusters diferentes Este porcentaje de agrupamiento es superior al clustering reportado en estudios realizados en el Instituto Pasteur 38% Guadeloupe y 55.3% del Insituto Osvaldo Cruz

Un patrón molecular idéntico puede indicar que los pacientes pertenecen a la misma cadena de infección sin embargo no demuestra que exista una conexión cercana entre los pacientes estudiados (*Seidler 2004*) Esta afirmación fue confirmada por nuestro estudio pues encontramos cepas molecularmente idénticas entre pacientes sin nexos epidemiológicos aparentes

El cluster D el más numeroso (40.5%) tiene la particularidad que el 80% (12/15) de las cepas agrupadas con ese patrón, proceden de Colón lo que convierte al patrón D en el patrón predominante para los pacientes con TB MDR en esta región de salud Dentro de

éste cluster se encuentran 4 personas fuertemente relacionadas por vínculos familiares. Dos de ellos eran tía y sobrina, de las cuales se desconoce si vivían o no en la misma residencia, aunque la tía tiene historia de vivir con un pariente con TB pulmonar que sospechamos pudo iniciar la cadena de transmisión. Otros dos pacientes indígenas tío y sobrino viven cerca, en el mismo vecindario en la ciudad de Colón.

En el estudio de estos casos, no encontramos nexos epidemiológicos entre estos 2 grupos con el mismo patrón molecular.

El segundo cluster predominante fue el cluster A (27.02%) el cual se subdividió en 3 subgrupos por diferencias en 1 banda. El 60% de las cepas que presentaron este patrón proceden de la región de Chiriquí. Algunos de ellos eran indígenas que habitaban en los mismos vecindarios.

El caso más interesante fue encontrado en el cluster B donde tía y sobrina que vivían en la misma residencia presentaron el mismo patrón molecular por DRE-PCR. De éstas pacientes la tía falleció de una tuberculosis meníngea y era madre de otro paciente con TB MDR que ingresó al PNCTB como caso nuevo. La paciente fallecida, tenía historia de 3 familiares contactos iniciales (tíos) muertos de tuberculosis sin historia de ser MDR pero sometidos a monoterapias encubiertas y se reporta tomaban el tratamiento autoadministrado sin supervisión. (Fuente: *Formulario de investigación micobacteriológico*)

El hijo de la paciente fallecida, no presentó el patrón molecular del cluster B ni ningún patrón molecular de Colón. Este paciente presentó un patrón molecular compatible con el cluster A de Chiriquí. En éste caso particular la epidemiología convencional se encaminaba a pensar en una transmisión madre-hijo sin embargo la caracterización

molecular confirma que es una cepa diferente por lo tanto no es un caso de resistencia primaria. Aunque no pudimos comprobarlo experimentalmente sospechamos que éste paciente pudo presentar una doble infección con cepas diferentes de *Mycobacterium tuberculosis* razón por la cual presentó un patrón molecular totalmente diferente a su madre y prima.

Al momento de realizado el estudio éste paciente terminó exitosamente su tratamiento de segunda línea y está curado Por otro lado la sobrina se encontraba en mal estado de salud y no se había curado

El caso de la paciente fallecida, con el cluster B pudo haber contagiado a su sobrina o viceversa, ya que por medio de los patrones obtenidos por DRE PCR y RFLP ambas tienen la misma cepa

Se identificaron otros clusters dentro del estudio como las cepas del cluster E (8.1%) que no eran cepas idénticas presentaban diferencias de 1 y 2 bandas entre ellas y con patrones de hasta 7 bandas No se determinaron vínculos epidemiológicos en éste cluster Las cepas del cluster H presentaron patrones idénticos todas con 7 bandas bien definidas Ambas pertenecen a regiones diferentes sin nexos epidemiológicos Las cepas del cluster C comparten un patrón no idéntico con diferencias en 3 bandas para una de las cepas ambas pertenecen a la región de Chiriquí sin información que los vinculen epidemiológicamente

El predominio del patrón del cluster D de los pacientes MDR en Colón puede deberse a la idiosincrasia de esta región del país La provincia de Colón tiene una historia única en base a información del Informe Mundial de Desarrollo Humano (INDH) (2000) la

provincia de Colon concentra el 72% de la población total de Panamá y mantiene el cuarto lugar en crecimiento poblacional con una tasa de 5%. Este crecimiento va asociado a la urbanización y a los problemas asociados a la pobreza urbana tales como hacinamiento y salubridad (*Centro Latinoamericano de estudios de la Poblacion (CELADE 2000)*). De acuerdo al censo nacional del año 2000 existen 49 715 viviendas ocupadas de las cuales 43.5% están en condiciones de hacinamiento, 16.6% con deterioro físico parcial y el 14.7% en deterioro total. La combinación del gran número de viviendas en deterioro, los altos índices de violencia y desempleo afectan considerablemente la calidad de vida del colonense (*Proyecto Revitalización Urbana y Alivio de la Pobreza en Colón MEF*). Estos factores elevan su vulnerabilidad a riesgos sociales entre los que se incluyen enfermedades transmisibles como la tuberculosis.

Debido a la historia natural del *Mycobacterium tuberculosis* su transmisión ha sido difícil de estudiar. La bacteria puede permanecer latente por años como una infección asintomática sin que pueda determinarse la fuente de infección. Personas que tienen la misma cepa pueden haberla compartido dentro de una cadena de transmisión común; por otro lado, las personas que presentan una cepa única y distinta, habrán sido infectados vía una exposición diferente (*Castro et al 2002*).

Estudios realizados en la comunidad en países desarrollados mostraron altos porcentajes de agrupamiento entre cepas de TB sugiriendo que la transmisión reciente de *M tuberculosis* es más frecuente (*Filliol et al 2000 Sajduda et al 2004*). Ello es contrario a lo que se pensaba en 1980 cuando se creía que la mayoría de los casos de TB resultaban de la reactivación de la tuberculosis adquirida en un pasado remoto. Actualmente los casos que se agrupan en clusters se atribuyen a casos de transmisión reciente del *M*

*tuberculosis* término que se refiere a la progresión de la enfermedad dentro de dos años de la infección

No podemos afirmar que todos los pacientes que forman parte de un cluster en nuestro estudio pertenecen a una misma cadena de transmisión ya que patrones idénticos fueron también obtenidos de aislados en regiones geográficamente separadas sin nexos epidemiológicos y algunos con historia de haber enfermado en un periodo de más de dos años a la fecha del estudio. Por lo tanto es posible que no todos los clusters obtenidos sean indicativos de transmisión reciente

Concordamos con varios estudios realizados en que el agrupamiento de las cepas puede presentarse entre individuos sin un nexo reciente de transmisión o a través de contactos por infección con una cepa circulante dentro de la comunidad (*Diel et al 2002 Chan Yeung et al 2003*). De forma que la utilización de estos agrupamientos o clusters como medida de transmisión reciente debe manejarse con cuidado

Muchos factores pueden explicar la situación encontrada en Panamá, sin embargo nos inclinamos a pensar que existe en Panamá una cepa de *M tuberculosis* que ejerce un dominio regional (*Diel et al 2002 Hamburg et al 2004*) la cual se ha estado esparciendo a lo largo del tiempo. Sospechamos que ésta cepa adquirió resistencia por selección de mutantes resistentes naturales por monoterapia real o encubierta, selección del medicamento por parte del enfermo o por abandonos. Debido a que en nuestro estudio solo analizamos las cepas de TB MDR, desconocemos si es un comportamiento general en las cepas tanto sensibles como resistentes pero se demostró que ha existido

transmisión de persona a persona lo que sugiere que alguno de estos pacientes presenta una resistencia primaria.

También podemos analizar el hecho que Panamá es un país geográficamente pequeño donde transportarse de un lugar a otro resulta fácil y en pocas horas personas que viven en un determinado pueblo o provincia suelen asistir a los mismos lugares de entretenimiento tomar transportes públicos iguales e incluso asistir a la misma instalación de salud lo que facilita el contacto de una persona con otra

En nuestro estudio encontramos vínculos epidemiológicos estrechos en 7 de los pacientes con TB MDR, lo que indica el posible surgimiento de casos de resistencia primaria, sin embargo también se obtuvieron patrones moleculares idénticos entre pacientes que no estaban epidemiológicamente relacionados Es evidente que existen patrones o clusters que predominan en unas regiones de Panamá Estudios realizados en otros países han mostrado una alta proporción de patrones o clusters sugiriendo que la transmisión reciente de *M tuberculosis* es más frecuente (Montoro et al 1998) Tomando en cuenta que la transmisión y la infectividad de las cepas de TB MDR es muy similar a la de una TB sensible ello facilita su diseminación

La técnica de RFLP constituye actualmente la técnica de referencia para el tipado de cepas de *M tuberculosis* y es posible que ésta identifique más cepas con diferentes patrones pues es más discriminativa, pero en este estudio no ofreció ninguna ventaja sobre el método de DRE PCR en el esclarecimiento de una situación epidemiológica La técnica de RFLP requiere equipo de laboratorio costoso y es una técnica que consume mucho tiempo Además la cantidad de DNA extraído necesario para realizar el procedimiento requiere que el cultivo primario tenga abundante crecimiento El

procedimiento completo puede tomar días hasta semanas para obtener resultados finales mientras que la técnica de DRE PCR es claramente más simple mas económica y rápida

La aplicación de la modificación al protocolo original (*Friedman et al 1995*) introducido por *Montoro y col* incrementó el poder discriminatorio de la técnica de DRE PCR

Nuestro estudio confirma los resultados obtenidos por Montoro en cuanto a la utilidad de la técnica de DRE PCR ya que utilizado como unico método produjo la misma información epidemiológica que el método de RFLP

Este estudio constituye el primer protocolo de caracterización molecular del *Mycobacterium tuberculosis* MDR en Panamá, convirtiéndolo en una base para futuros estudios de epidemiología molecular de TB en el país

## **D CONCLUSIONES**

- 1 El perfil de resistencia encontrado con mayor frecuencia entre los 37 pacientes MDR, fue el de *INH RFP SM*
- 2 El 54% de los pacientes presentó resistencia a todas las drogas probadas in Vitro convirtiéndolos en candidatos a tener una tuberculosis XDR (Extremadamente resistente)
- 3 Existe un alto porcentaje de agrupamiento o clustering entre los aislados de TB MDR en Panamá
- 4 El análisis de los patrones o clusters de los pacientes TB MDR en Panamá confirma que existen en Panamá patrones característicos predominantes en ciertas regiones de salud
- 5 La adicción a las drogas la infección por el VIH y ciclos de tratamientos previos son alguno de los factores que en nuestro estudio encontramos como riesgo para adquirir una infección por TB MDR
- 6 Por medio del DRE PCR se confirmaron nexos epidemiológicos entre algunos pacientes miembros de un cluster indicando que pertenecen a la misma cadena de transmisión
- 7 Los patrones encontrados indican que se está diseminando la enfermedad y los vínculos familiares entre algunos de los pacientes afectados y el elevado porcentaje de agrupamiento encontrado lo demuestran
- 8 Se demostró la utilidad del DRE PCR como herramienta adicional para estudios epidemiológicos del *Mycobacterium tuberculosis* multidrogoresistente en Panamá.

## **E RECOMENDACIONES**

- 1 Realizar el estudio de caracterización molecular en cepas sensibles y resistentes para confirmar la existencia de una cepa que ejerce dominio regional en Panamá**
- 2 Poner a disponibilidad del Ministerio de Salud las herramientas moleculares utilizadas en este estudio como complemento a la epidemiología convencional para su uso en el esclarecimiento de alguna situación epidemiológica en el país**
- 3 Realizar futuros estudios de caracterización molecular que complementen los resultados obtenidos en esta investigación específicamente en las regiones donde se encontró un alto porcentaje de agrupamiento**
- 4 Reforzar las estrategias de control de la tuberculosis en las regiones con alta incidencia de la enfermedad**

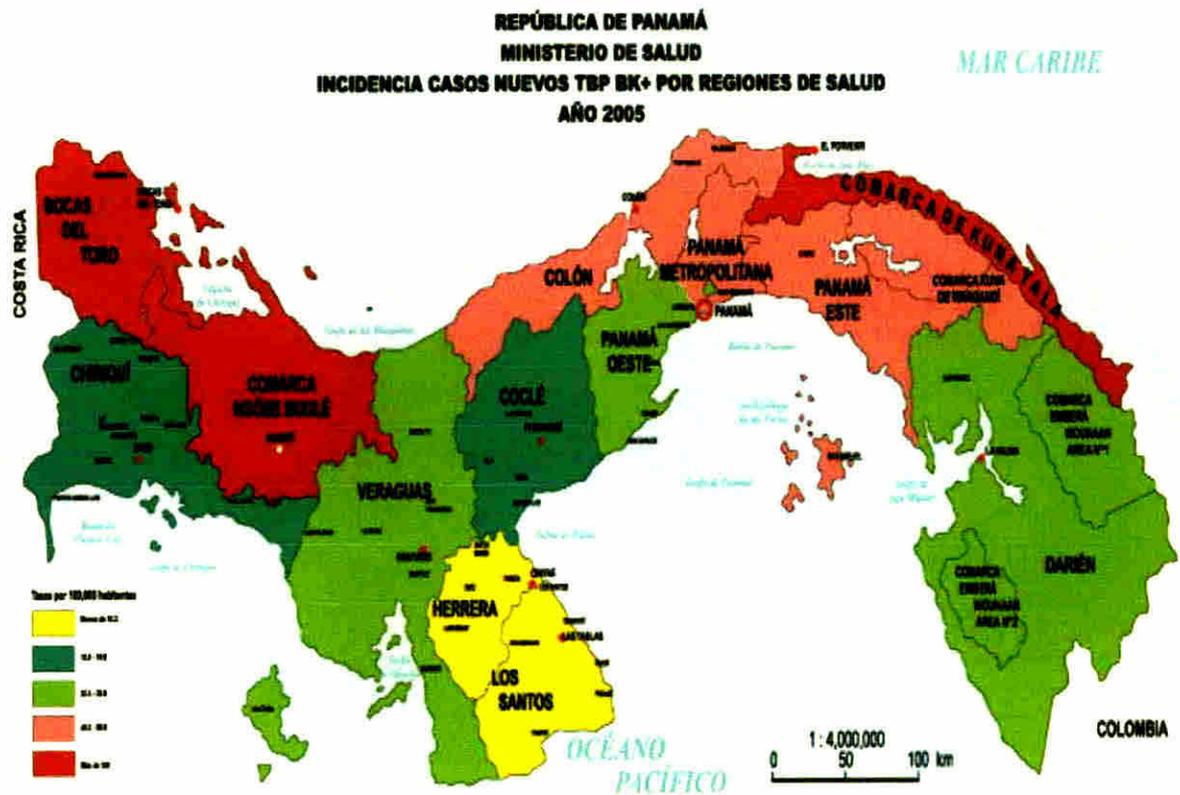
# **ANEXOS**

**A1 TASA DE INCIDENCIA ESTIMADA DE TUBERCULOSIS (AMERICA LATINA) 2005**

<b>Tasa de incidencia estimada por 100.000 hab.</b>			
<b>&gt; 85</b>	<b>&gt;50-84</b>	<b>25-49</b>	<b>&lt;24</b>
<b>Bolivia</b>	<b>Bahamas</b>	<b>Argentina</b>	<b>Caribe</b>
<b>Ecuador</b>	<b>Brasil</b>	<b>Belice</b>	<b>inglés</b>
<b>Guatemala</b>	<b>Colombia</b>	<b>Chile</b>	<b>Costa Rica</b>
<b>Guyana</b>	<b>El Salvador</b>	<b>México</b>	<b>Cuba</b>
<b>Haití</b>	<b>Panamá</b>	<b>Uruguay</b>	<b>Canadá</b>
<b>Honduras</b>	<b>Paraguay</b>	<b>Venezuela</b>	<b>EUA</b>
<b>Nicaragua</b>	<b>Surinam</b>		<b>Jamaica</b>
<b>República Dominicana</b>			<b>Puerto Rico</b>
<b>Perú</b>			

**Fuente Hoja Notas Informativas 2004 Américas OPS/OM**

## A.2 TASAS DE INCIDENCIA DE LA TUBERCULOSIS EN LA REPÚBLICA DE PANAMÁ, AÑO 2005.



Fuente: PNCTB- Epidemiología

## FORMULARIO DE SOLICITUD DE INVESTIGACIÓN MICOBACTERIOLÓGICA

	 <b>salud</b> MINISTERIO DE SALUD INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS DE ESTUDIOS DE LA SALUD LABORATORIO CENTRAL DE REFERENCIA EN SALUD PUBLICA <b>SOLICITUD PARA INVESTIGACIÓN MICOBACTERIOLÓGICA.</b>	<b>Código</b> <b>Revisión</b> <b>Fecha</b> <b>Página</b>	<b>F MB/007</b> <b>1</b> <b>05/30/2007</b> <b>74 de 104</b>

ón	Instalación de Salud	Médico Solicitante
----	----------------------	--------------------

### OS DEL PACIENTE

Ido paterno	Apellido materno	Nombres	Edad	Sexo	Cédula o SS
-------------	------------------	---------	------	------	-------------

### MEN SOLICITADO

Exámen directo <input type="checkbox"/>	Cultivo <input type="checkbox"/>	Sensibilidad <input type="checkbox"/>	Tipificación <input type="checkbox"/>
---	----------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------

### OS SOBRE LA MUESTRA

Fecha de toma de la muestra		Fecha de envío al L.C.R.S.P			
Tipo de muestra	<b>Espito</b> Diagnósticas <input type="checkbox"/> Control <input type="checkbox"/>	Otras <input type="checkbox"/>	<b>Especifique</b>	<b>Cepas</b> <input type="checkbox"/>	

### OS SOBRE EL DIAGNÓSTICO

Precedentes de tratamiento	Nunca tratado <input type="checkbox"/>	Antes tratado	Recaída <input type="checkbox"/>	Abandono <input type="checkbox"/>	Crónico <input type="checkbox"/>	Curado <input type="checkbox"/>	T terminado <input type="checkbox"/>			
Estado de la Baciloscopia	Diagnósticas	1	2	Control	1	2	3	4	5	6

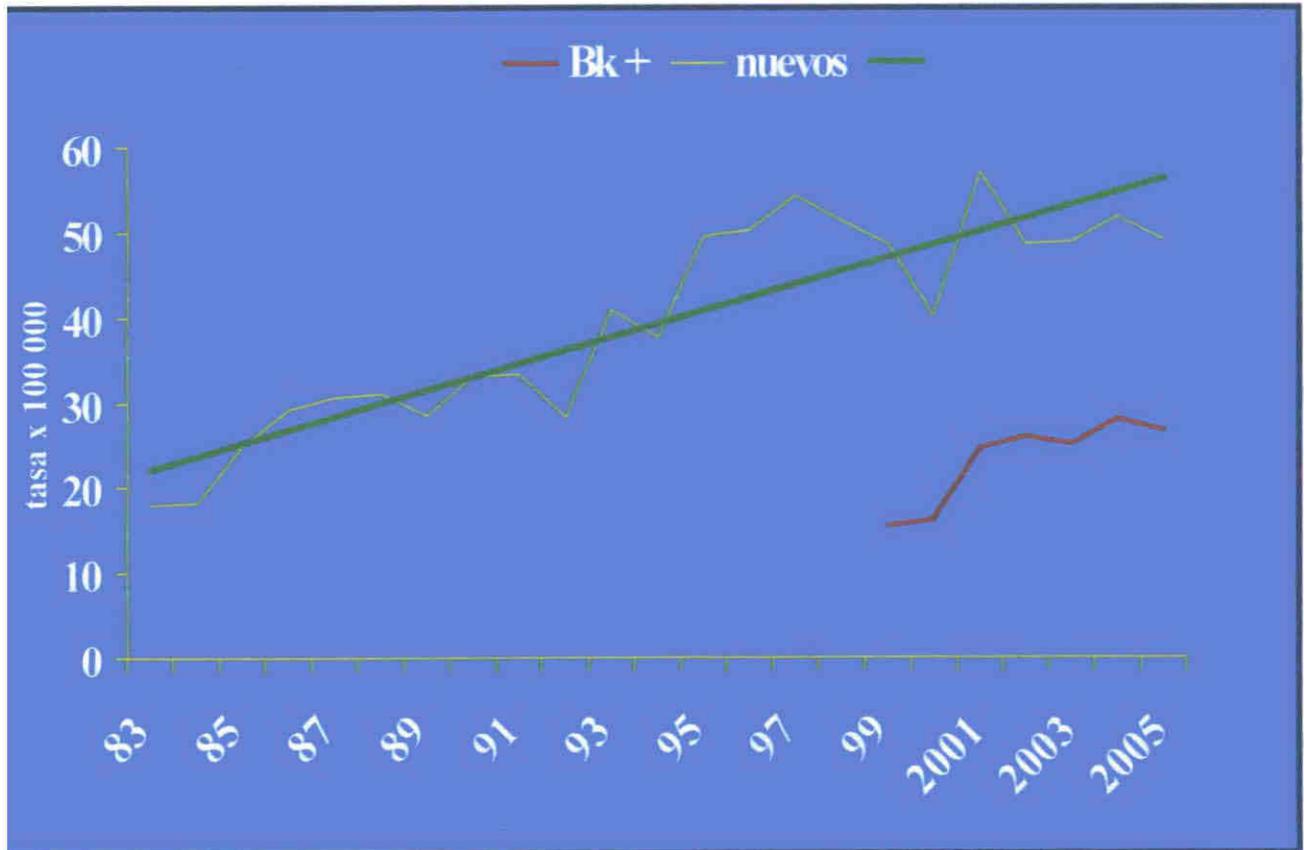
### ORIA FACILITADA POR EL PACIENTE

Historia de HIV	Historia de drogadicción	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Especifique
Historia sobre tratamiento previo antituberculoso	Lugar	Fecha	Tiempo	
Medicamentos administrados	Especifique			
Dosis de tratamiento administrados	Especificar N			
Estado del último tratamiento según el paciente	curado <input type="checkbox"/>	no curado <input type="checkbox"/>	no sabe <input type="checkbox"/>	

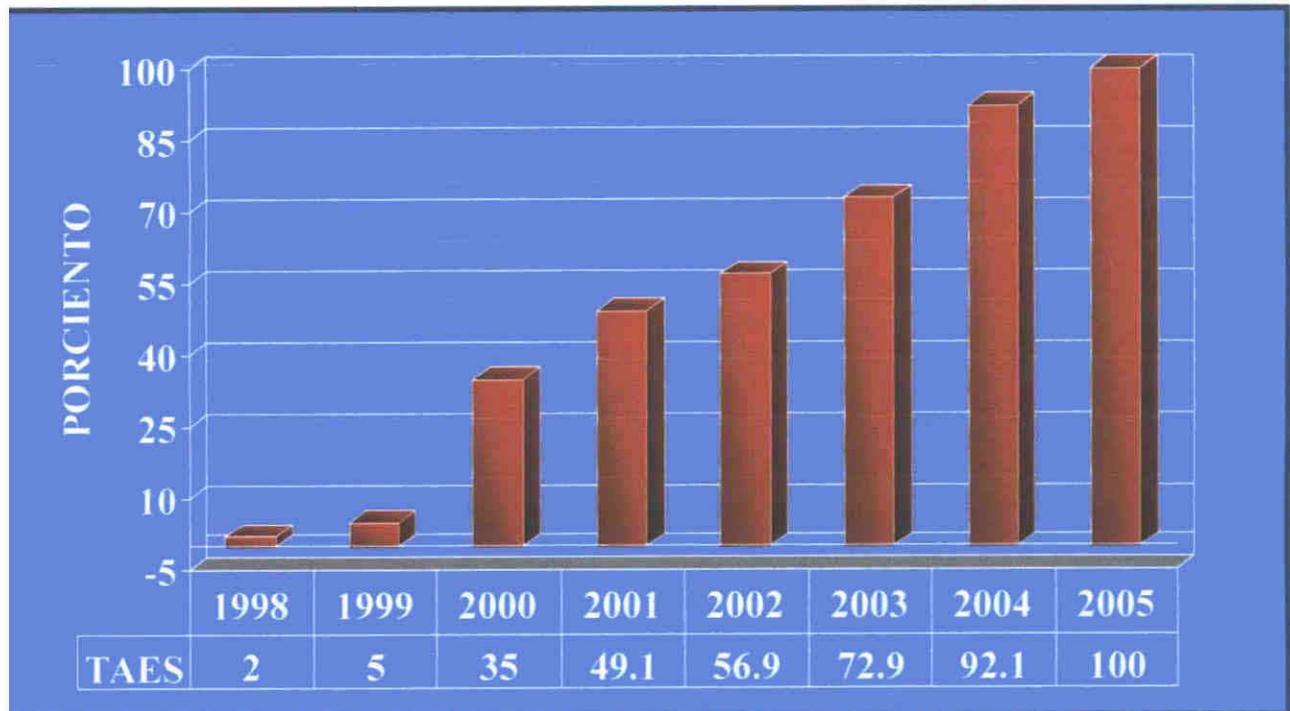
**Funcionario responsable**

Toda solicitud de cultivo y prueba de sensibilidad deberá ser enviada con éste formulario al Laboratorio Central de referencia en Salud pública y será requisito indispensable para formalizar cualquier tratamiento con droga de segunda línea al enviar la muestra de acuerdo a normas de transporte y manejo de sustancias infecciosas

### I. CASOS NUEVOS DE TUBERCULOSIS Y BK+ PANAMÁ 1983 – 2005



Fuente: PNCTB- Epidemiología

**COBERTURA POBLACIONAL DE LA ESTRATEGIA TAES PANAMÁ 1998 – 2005**

**Fuente:** PNCTB- Epidemiología

**A 6 TABLA DE LA INFORMACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LOS PACIENTES  
MDR ESTUDIADOS**

<b>N</b>	<b>Edad</b>	<b>Consumo de Drogas</b>	<b>Prueba de VIH</b>	<b>Sexo</b>	<b>Trat Previo</b>
02 01	15	NO	NEG	F	No
02-02	24	NO	NEG	F	SI
02-03	33	NO	NEG	M	SI
02-04	32	SI	POS	M	NO
02-05	34	NO	NEG	M	SI
02-06	31	NO	NEG	F	SI
02 07	33	NO	NEG	M	SI
02 08	35	NO	NEG	F	SI
02 09	44	NO	NEG	M	SI
03 01	28	NO	NEG	F	SI
03 03	31	NO	NEG	F	SI
03-04	19	NO	NEG	M	SI
03-05	36	NO	NEG	M	SI
03-06	20	NO	NEG	F	SI
03-07	21	NO	NEG	M	SI
03 08	16	NO	NEG	M	SI
03-09	30	SI	NEG	M	SI
03 10	35	SI	NEG	M	SI
03 11	34	NO	NEG	F	SI
03 12	53	NO	NEG	F	SI
03 13	18	NO	NEG	M	SI
03 14	24	NO	NEG	F	SI
03 15	31	SI	NEG	M	SI
03 16	40	NO	NEG	M	SI
03 17	43	NO	NEG	M	SI
04-01	34	SI	SI	F	SI
04 02	31	SI	SI	M	SI
04-03	51	NO	NEG	M	SI
04-04	32	NO	SI	M	NO
04 05	19	SI	NEG	M	SI
04-06	46	NO	NEG	M	SI
04-07	23	NO	NEG	F	SI
04-08	39	NO	NEG	F	SI
04-09	57	SI	NEG	M	SI
04 10	42	NO	NEG	M	NO
04 11	34	NO	NEG	M	SI
04 12	32	SI	NEG	M	SI

**E BIBLIOGRAFIA**

- 1 Anónimo 2004 Notas Informativas Programa Nacional para el control de la tuberculosis Ministerio de Salud Panamá
- 2 Beck Sagué C Dooley SW Hunton MD Otten J Breeden A Crawford JT Pitchenik AE Wooddley C Cauthen G Jarvis WR 1992 Hospital outbreak of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections factors in transmission to staff and HIV infected patients. *JAMA* **268** 1280-1286
- 3 Braden CR Templeton GL Cave MD *et al* 1997 Interpretation of Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with large rural population *J Infect Dis* **175** 1446-1452
- 4 Boudville IC Wong SY Snodgrass I Drugresistant tuberculosis in Singapore *Ann Acad Med Singapore* 1997 **26** 549-56
- 5 Burgos M V Pym A S 2002 Molecular Epidemiology of tuberculosis *Eur Respir J* **20** 548-658
- 6 Caminero L J 2003 Guía de la Tuberculosis para especialistas Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER) Pag 52-54 127-135
- 7 Castro K Jaffe H 2002 Rationale and Methods for the National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network *Emerg Infect Dis* **8**(11)
- 8 Castro Arachu Farmer Paul Infectious disease in Haiti Science and Society 2003 *Embo Reports* Vol 4 especial issue

- 9 Chan Yeung M Tam C M Wong H Leung CC Wang J Yew WW et al 2003  
Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in Hong Kong A  
population based prospective study *J Clin Microbiol* 41 2706–8
- 10 Cole ST 1994 *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance mechanisms *Trends  
Microbiol* 2 411 5
- 11 Cole T et al 1993 Deciphering The Biology Of *Mycobacterium tuberculosis* From  
The Complete Genome Sequence *Nature* 393 537 544 10 1038 31159
- 12 Comité asesor de la OPS/OMS 1986 Sensibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a  
las drogas e Identificación de Micobacterias *Manual de Normas y Procedimientos  
tecnicos para la Bacteriologia de la Tuberculosis* Pag 9 25
- 13 Crecimiento Estructura y Distribución de la población Centro Latinoamericano de  
estudios de la Población, CELADE New York 2000
- 14 Dale JW Mat Nor R Ramayah S Tang TH Zainuddin Z 1998 Molecular  
Epidemiology of Tuberculosis in Malaysia. *J Clin Microbiol* 37(5) 1265–1268
- 15 Daley CH 2002 Transmission of Multidrug Resistant Tuberculosis  
Limited by Man or Nature? *Am J Respir Crit* Vol 165 742 743
- 16 Daniel TM Ellner JJ 1993 Immunology of tuberculosis A comprehensive  
international approach *Lung biology in health and disease*
- 17 Diaz R, Kremer K de Haas PE et al 1998 Utility of Spoligotyping versus IS6110  
restriction fragment length polymorphism *Int J Tuberc Lung Dis* 2 743 750
- 18 Diel R, Schneider S Meywald Walter K, Ruf C M Rusch Gerdes S Niemann S  
2002 Epidemiology of tuberculosis in Hamburg Germany Long term population

- based analysis applying classical and molecular epidemiological techniques *J Clin Microbiol* **40** 532-9
- 19 Dooley S W Jarvis W R Martone W J Snyder D E Jr 1992 Multi Drug resistant tuberculosis *Ann Intern Med* **117** 257 8
- 20 Doroudchi M, Kremer K Basiri EA Kadivar MR, Van Soolingen D Ghaderi AA 2000 IS6110-RFLP and Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Iran *Scand J Infect Dis* **32** 663-668
- 21 Edlin Br Tokars JI Grieco MH Crawford JT Williams J Sordillo EM Ong KR Kilburn JO Dooley SW Castro KR, Jarvis WR, Holmberg SD 1992 An outbreak of multidrug resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome *N Engl J Med* **326** 1514-1521
- 22 Fenton M Vermeulen M 1996 Immunopathology of Tuberculosis Roles of Macrophages and Monocytes *Infection and Immunity* **64** 683-690
- 23 Figueroa MC 2001 Respuesta inmune a la infección por mycobacterium tuberculosis una revisión de la literatura. *Rev inst nal enf resp mex* **14** no 2
- 24 Filliol I Ferdinand S Negroni L Sola, CH Rastogi N 2000 Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* base on variable number of Tandem DNA Repeats used alone and in Association with Spoligotyping *Journal of Clinical Microbiology* Vol **38** 2520-2524
- 25 Fischl MA Uttamchandani RB Daikos GL Poblete RB Moreno JN Reyes RR Boota AM Thompson LM Cleary TJ Lai S 1992 An outbreak of tuberculosis

- caused by multiple-drug resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection  
*Ann Intern Med* **117** 177 183
- 26 Fox C Zabala ME Cruz A Garí F Sirviera S Ganev I Brakarz J Coronado M  
Revitalización Urbana y Alivio de la Pobreza en Colón N PN 144 Ministerio de  
Economía y Finanzas Panamá, Republica de Panamá.
- 27 Friedman C Stoeckle M Johnson W Riley L 1995 Double Repetitive Element  
PCR Method for Subtyping *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates *Journal  
of Clinical Microbiology* **33** No5 1383 1384
- 28 Gale E F Cundliffe E Reynolds M Richmond H Waring MJ 2001 The  
molecular bases of antibiotic action John Wiley Inc and Sons New York
- 29 Guevara G Hernandez A Cuevas R 2003 Tuberculosis y la importancia de  
incorporar nuevas metodologías diagnósticas *Med UNAB* **6** 16
- 30 Hermans PW Van Soolingen D Van Embdejn JD 1992 Characterization of a  
major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use  
in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae* *J  
Bacteriology* **174** 4157-4165
- 31 Informe Mundial del desarrollo Humano (INDH) Panama 2000 Fuente de los datos  
Contraloría General de la Republica, Dirección de estadística y censo
- 32 Iseman MD Sbarbaro JA 1992 The increasing prevalence of resistance to  
antituberculosis chemotherapeutic agents implications for global tuberculosis  
control *Curr Clin Top Infect Dis* **12** 188 204
- 33 Jaén E 2000 Estado actual de la información sobre antecedentes socioeconómicos  
Depósito de documentos de la FAO

- 34 Kamembeek J Schouls L Kolk A et al 2001 Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology *J Clin Microbiol* **35** 907-914
- 35 Kantor I 1998 *Bacteriología de la Tuberculosis Humana y Animal* Organización Panamericana de Salud Pag 40-96
- 36 Kapur V Li LL Iordanescu S Hamrick MR Wanger A Kreisworth R N et al 1994 Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase  $\beta$ -subunit in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas *J Clin Microbiol* **32** 1095-8
- 37 Katoch V M 2003 Advances in Molecular diagnosis of Tuberculosis *Central JALMA Institute for Leprosy (ICMR)* Tajganj Agra 282-001 **59** 182-186
- 38 Kaul K 2001 Molecular Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Impact on Patient Care *Clinical Chemistry* **47** 8 1553-1558
- 39 Kochi A Vareldzis B Styblo K 1993 Multi Drug resistant tuberculosis and control *Res Microbiol* **144** 104-110
- 40 Laboratorio Central de Referencia en Salud Publica 2004 Sección de Micobacteriología Prueba de Sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis* por el metodo de Canetti Rist y Grosset. *Manual de Procedimientos Tecnicos de la Bacteriología de la Tuberculosis* Panama.
- 41 Levin ME Hatfull GF 1993 *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase DNA supercoiling action of Rifampicin and mechanism of Rifampicin resistance *Mol Microbiol* **8** 277-85

- 42 Lisitsyn N A Sverdlov ED Molseyeva EP Danilevskaya ON Nikiforov VG 1984 Mutation to rifampin resistance at the beginning of the RNA polymerase beta subunit gene in *Escherichia coli* *Mol Gen Gent* **196** 173 174
- 43 Mazars E Lesjean S Banuls AL *et al* 2001 High resolution minisatellite based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology *Proc Natl Acad Sci USA* **98** 1901 1906
- 44 Montoro E Valdivia J Cardoso S 1998 Molecular Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Havana, Cuba, by IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and by the Double Repetitive Element PCR Method *Journal of Clinical Microbiology* **36** No 10 3099–3102
- 45 Munk ME Kaufmann SH 1991 The immune response to *Mycobacterium tuberculosis* *Behring Inst Mitt* **88** 27 35
- 46 Maltez F Perez H Machado J Peña T Cardoso O Rodriguez P Marins T Correia F Serrano A Rodriguez A 2003 Multidrugresistant tuberculosis and HIV infection a Review concerning 102 patients
- 47 Mc Gowan Jr JE 1995 Nosocomial tuberculosis New progress in control and prevention. *Clin Infec Dis* **21** 489 505
- 48 Morris S L Bai Gh Suffys P Portillo-Gomez L Fairchok M Rouse D 1995 Molecular mechanisms of multidrug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* *J Infect Dis* **171** 954–60
- 49 Nosocomial transmission of MDR TB among HIV infected persons Florida and New York 1998 1991 *MMWR* **191** **40** 585 91

- 50 Organización Mundial de la Salud (OMS) 2005 *Global Tuberculosis Report* Geneva WHO Data compiled from the year 2003
- 51 Organización Mundial de la Salud (OMS) 2003 *Guidelines for Surveillance of Drug resistance in Tuberculosis* WHO/TB 320
- 52 Organización Mundial de la Salud (OMS) *Los Servicios de laboratorio en el control de la tuberculosis Microscopia* WHO/TB/98 258
- 53 Organización Panamericana de la Salud (OPS) 2004 *Reporte Global de la Tuberculosis* OPS /TB/7/ N 2
- 54 Palmera D Pitocco V Ambraggi M 2003 Multidrugresistant tuberculosis in HIV negative patients Buenos Aires Argentina. *Emerging Infectious disease* Vol 9 N8
- 55 Perkins M 2000 New diagnostic tools for tuberculosis UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) Geneva, Switzerland *Int J Tuberc lung dis* 4(12) S182 S188
- 56 Ramachandran R Paramasivan C R 2003 What is new in the diagnosis of Tuberculosis? *Indian Journal of tuberculosis* 50 197 208
- 57 Rattan A Awdhesh K Nagar A 1998 Multidrug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Molecular Perspectives *Emerging infectious disease* 4(2) 1 18
- 58 Sajduda A Brzostek A Poplawska M et al 2004 Molecular characterization of Rifampin and Isoniazid Resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland *Journal of Clinical Microbiology* Vol 42 2425 2431
- 59 Seidler A Nienhaus A Diel R 2004 The transmisión of tuberculosis in the light of new molecular biological approaches *Occup Environ Med* 61(2) 96 102

- 60 Sherman D R Mdluli K Hickey M J Arain T M Morris S L Barry C E III  
Stover C K 1996 Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid resistant  
*Mycobacterium tuberculosis* *Science* **272** 1641-3
- 61 Shoeb H A Bowman B U Ottolenghi A C Merola A J 1985 Peroxidase mediated  
oxidation of Isoniazid *Antimicrobial agents Chemother* **27** 399-403
- 62 Smith I 2003 *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular  
Determinants of Virulence *Clinical Microbiology Reviews* **16** 463-496
- 63 Soini H Musser J 2001 Molecular diagnosis of Mycobacteria *Clinical Chemistry*  
**47** 5 809-814
- 64 Spellman C W Matty J K Weis S E A Survey of drug resistant *Mycobacterium*  
*tuberculosis* and its relationship with HIV infection *AIDS* 1998 **12** 191-5
- 65 Steck P A Schwartz B A Rosendahl M S Gray G R 1978 Mycolic acids a  
reinvestigation *J Biol Chem* **253** 5625-5709
- 66 Sumartojo E 1993 When Tuberculosis Treatment Fails A social behavior account  
of patient adherence *Am Rev Respir Dis* **147** 1311-1320
- 67 Supply P Magdalena J Himpenys S Locht C 1997 Identification of novel  
intergenic repetitive units in a Mycobacterial two component system operon *Mol*  
*Microbiol* **26** 991-1003
- 68 Telenti A Imboden P Marchesi F Lowrie D Cole S Colston M J Matter L  
Schopfer K Bodmer T 1993 Detection of Rifampicin resistance mutations in  
*Mycobacterium tuberculosis* *Lancet* **341** 647-650

- 69 Thierry D Bisson Noel A Ferebault V Guedson JL Guicquel B 1990  
Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence IS6110 and its  
application and diagnosis *J Clin Microbiol* **28** 2668-2673
- 70 Van Embden J D A Cave M D Crawford J T Dale J W Eisenach K D Guicquel B  
Hermans P W M Martin C McAdam R, Shinnick T M Small P M 1993 Strain  
identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting  
recommendations for a standardised methodology *J Clin Microbiol* **31** 406-409
- 71 Van Soolingen D Hermans P W Hopewell P C et al 1993 Occurrence and stability  
of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains evaluation of  
an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of  
tuberculosis *J Clin Microbiol* **29** 2578-2586
- 72 Weltman A C Rose D N Tuberculosis susceptibility patterns predictors of MDR and  
Implications of initial therapeutic regimens at New York City Hospital *Arch Intern  
Med* 1994 **154** 2161-7
- 73 Williams D L Waguespack C Eisenach K Crawford J T Portaels M Salfinger  
M et al 1994 Characterization of Rifampicin resistance in pathogenic  
*Mycobacteria* *Antimicrob Agents Chemother* **38** 2380-6
- 74 Wilkison D Pillay M Davies G R Sturm A W 1996 Resistance to antituberculosis  
drugs in rural South Africa. Rates Pattern risks and transmission dynamics *Trans R  
Soc Trop Med Hyg* **90** 692-5
- 75 Winder F G Collins P B 2002 Mode of action of the antimycobacterial agents and  
associated aspects of the molecular biology of the *Mycobacteria*. *Academic Press  
London* P353-438

- 76 World Health Organization 2003 *Guidelines for National Programmes* Third edition Geneva Switzerland
- 77 World Health Organization 2006 *National tuberculosis Day* Geneva Switzerland
- 78 Yang ZH Bates JH Eisenach kd Cave MD 2001 Secondary typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with matching IS6110 fingerprints frxoxm dihffferente geographic region of the United States *J Clin Microbiol* 39 1691 1695
- 79 Zhang Y Heym B Allen B Young D Cole S 1992 The catalase-peroxidase gene and Isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* *Nature* 358 591 3
- 80 Zhang Y Garbe T Young D 1993 Transformation with katG restores Isoniazid sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations *Mol Microbiol* 8 521-4