



UNIVERSIDAD DE PANAMA

VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA

***IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES MAS FRECUENTES QUE CONFIEREN  
RESISTENCIA A RIFAMPICINA E ISONIACIDA EN AISLADOS DE  
TUBERCULOSIS MULTIDROGA RESISTENTE EN PANAMA***

AUTOR

FEDORA LANZAS QUINTANA

CÉDULA 8 714 814

ASESOR

PROFESOR CARLOS RAMOS

**COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIZACIÓN EN GENÉTICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

OCTUBRE 2014

ST  
10 MAR 2015



Titulo de la Tesis: "**Identificación de mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a rifampicina e isoniacida en aislados de tuberculosis multidroga resistente en Panamá**"

TESIS

Sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas,  
opción Genética y Biología Molecular

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado  
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

APROBADO POR:

\_\_\_\_\_  
**Carlos Ramos**

**Doctor Carlos Ramos**  
**Presidente**

\_\_\_\_\_  
**Sara Ahumada**

**Doctora Sara Ahumada**  
**Miembro**

\_\_\_\_\_  
**Brenda Mayorga**

**Profesora Brenda Mayorga**  
**Miembro**

REFRENDADO POR:

\_\_\_\_\_  
**Namys Raymundo**  
**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA**  
**DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA:

\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

**Gracias a Dios Todopoderoso quien es el único con el poder de dar y quitar  
Gracias por darme la fortaleza y perseverancia para culminar esta fase del  
estudio sobrepasando cada una de las vicisitudes encontradas en el camino**

**Gracias a mi familia, y en este grupo incluyo a cada uno de mis amigos por  
darme apoyo y voz de aliento en el momento oportuno**

**Gracias a cada uno de los colaboradores nacionales e internacionales por su  
apoyo incondicional en cada una de las fases del estudio**

**Gracias a cada uno de los profesores del Programa de Maestría que  
contribuyeron en mi formación para la obtención de este nuevo grado en mi  
carrera profesional Muy especialmente al Profesor Carlos Ramos por su  
guía y apoyo como tutor nacional y al Dr Petros Karakousis y al Dr Thomas  
Ioerger como tutores internacionales**

**Entonces el Señor dijo Si tuvierais fe como un grano de mostaza podríais  
decir a este sicomoro Desarraigate y plantate en el mar y os obedecería.**

**Lucas 17:6**

*En memoria de todos aquellos  
que han sufrido directa o indirectamente  
por la Tuberculosis*

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS</b>	<b>6</b>
<b>FUNDAMENTACION TEÓRICA</b>	<b>7</b>
<b>    1 GENERALIDADES DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<b>7</b>
<b>        1 1 Descubrimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<b>7</b>
<b>        1 2 Características Morfológicas y taxonomía de <i>M. tuberculosis</i></b>	<b>9</b>
<b>        1 3 Componentes de la envoltura de <i>M. tuberculosis</i> y su rol en la inmunopatogénesis</b>	<b>16</b>
<b>            1 3 1 Componentes estructurales</b>	<b>17</b>
<b>                1 3 1 1 Componentes con alto contenido de Manosa</b>	<b>22</b>
<b>                1 3 1 2 Componentes ricos en Arabinosa y Galactosa</b>	<b>25</b>
<b>            1 4 Genoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<b>27</b>
<b>    2 Patogenia de la Tuberculosis</b>	<b>31</b>
<b>        2 1 Exposición sin infección</b>	<b>33</b>
<b>        2 2 Infección latente</b>	<b>34</b>
<b>        2 3 Enfermedad</b>	<b>35</b>
<b>            2 3 1 Manifestaciones clínicas de la enfermedad</b>	<b>37</b>
<b>    3 Tratamiento</b>	<b>39</b>

<b>3 1 Mecanismo de acción y mecanismo de resistencia de los principales fármacos del tratamiento antifílmico Isoniacida y Rifampicina</b>	<b>48</b>
<b>3 1 1 Isoniacida</b>	<b>48</b>
<b>3 1 1 1 Mecanismo de acción de la Isoniacida</b>	<b>48</b>
<b>3 1 1 2 Genes involucrados en los mecanismos de resistencia a Isoniacida</b>	<b>50</b>
<b>3 1 2 Rifamicinas</b>	<b>55</b>
<b>3 1 2 1 Mecanismo de Acción de Rifampicina</b>	<b>57</b>
<b>3 1 2 2 Gen involucrado en los mecanismos de resistencia a Rifampicina</b>	<b>58</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>61</b>
<b>1 TIPO DE ESTUDIO</b>	<b>61</b>
<b>2 UNIVERSO</b>	<b>61</b>
<b>3 MUESTRAS</b>	<b>61</b>
<b>4 CRITERIO DE INCLUSION</b>	<b>61</b>
<b>5 CRITERIO DE EXCLUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>6 METODOS</b>	<b>62</b>
<b>6 1 Identificación a nivel molecular de las cepas en estudio utilizando el kit comercial ACCUPROBE GENPROBE</b>	<b>62</b>
<b>6 2 Extracción de ADN genómico utilizando el kit comercial de Qiagen</b>	<b>68</b>

<b>6 3 Amplificación de los genes katG inhA inhA mabA y rpoB involucrados en la resistencia a Isoniacida y Rifampicina respectivamente</b>	<b>69</b>
<b>6 3 1 Electroforesis en gel de agarosa</b>	<b>71</b>
<b>6 3 2 Purificación de productos de PCR</b>	<b>72</b>
<b>6 4 Secuenciación de los genes involucrados en la resistencia a Rifampicina e Isoniacida de las cepas en estudio e identificación de las mutaciones</b>	<b>73</b>
<b>6 4 1 Edición de secuencias</b>	<b>73</b>
<b>6 4 2 Análisis de los productos de secuenciación</b>	<b>74</b>
<b>6 5 Reacción en cadena de la polimerasa múltiple alelo específico (PCRMAS)</b>	<b>74</b>
<b>6 5 1 Ciclo de amplificación</b>	<b>75</b>
<b>6 5 2 Detección</b>	<b>75</b>
<b>6 6 Comparación de los resultados obtenidos por PCRMAS</b>	<b>76</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>77</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>131</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>137</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>139</b>
<b>CITAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>140</b>

## **INDICE DE TABLAS**

<b>TABLA 1</b> <b>Diferencias entre la infección de tuberculosis latente y la enfermedad de tuberculosis</b>	<b>37</b>
<b>TABLA 2</b> <b>ACCUPRO Luminómetro 50i</b>	<b>67</b>
<b>TABLA 3</b> <b>Mezcla de Reacción para la amplificación de los genes en estudio</b>	<b>71</b>
<b>TABLA 4</b> <b>Mezcla de reacción para secuenciación</b>	<b>73</b>
<b>TABLA 5</b> <b>Mezcla de reacción para PCRMAS</b>	<b>75</b>
<b>TABLA 6</b> <b>Concentraciones de ADN</b>	<b>89</b>
<b>TABLA 7</b> <b>Mutaciones identificadas por secuenciación de Aislados multidroga resistente</b>	<b>118</b>

**TABLA 8** 120

**Mutaciones identificadas por secuenciación de Aislados sensibles**

**TABLA 9** 124

**Mutaciones identificadas por PCRMAS de Aislados multídroga resistente**

**TABLA 10** 126

**Mutaciones identificadas por PCRMAS de Aislados sensibles**

## **INDICE DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1</b>	<b>22</b>
Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	
<b>FIGURA 2</b>	<b>26</b>
Inmunopatogénesis de la Tuberculosis pulmonar	
<b>FIGURA 3</b>	<b>36</b>
Patogenia de la tuberculosis	
<b>FIGURA 4</b>	<b>40</b>
Representación esquematizada de la enfermedad de un foco caseoso	
<b>FIGURA 5</b>	<b>47</b>
Fármacos contra <i>M. tuberculosis</i>	
<b>FIGURA 6</b>	<b>48</b>
Estructura química de la Isoniacida	
<b>FIGURA 7</b>	<b>52</b>
Esquema de la ruta biosintética de los ácidos grasos y ácidos micólicos en micobacterias	

<b>FIGURA 8</b>	<b>90</b>
Productos de amplificación de los genes <i>inhA</i> , <i>inhA mabA</i> , <i>katG</i> y <i>rpoB</i>	
<b>FIGURA 9</b>	<b>121</b>
Electroforesis de los genes <i>inhA</i> , <i>inhA mabA</i> , <i>katG</i> y <i>rpoB</i>	
<b>FIGURA 10</b>	<b>122</b>
Electroforesis de los productos de amplificación de PCRMAS	
<b>FIGURA 11</b>	<b>123</b>
Electroforesis de los productos de amplificación de PCRMAS	
<b>FIGURA 12</b>	<b>132</b>
Mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a INH en aislados MDR	
<b>FIGURA 13</b>	<b>133</b>
Mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a RIF en aislados MDR	
<b>FIGURA 14</b>	<b>135</b>
Rango de edad versus género de los aislados en estudio	
<b>FIGURA 15</b>	<b>136</b>
Porcentaje de casos MDR por año y distribución geográfica	

## **INDICE DE CUADROS**

<b>CUADRO 1</b>	<b>10</b>
<b>Clasificación segun el Bergey s Manual of Systematic Bacteriology</b>	
<b>CUADRO 2</b>	<b>11</b>
<b>Clasificación de micobacterias que causan frecuentemente infecciones en humanos (Runyon 1959)</b>	
<b>CUADRO 3</b>	<b>15</b>
<b>Complejo Mycobacterium tuberculosis</b>	
<b>CUADRO 4</b>	<b>70</b>
<b>Cebadores y condiciones para la amplificación de los genes en estudio</b>	
<b>CUADRO 5</b>	<b>74</b>
<b>Lista de cebadores para PCRMAS</b>	

## **ABREVIATURAS**

- 1 AG** Arabinogalactano
- 2 BAAR** Bacilo alcohol ácido resistente
- 3 BCG** Bacillus de Calmette y Guérin
- 4 DIM** Fthicerol dímicocerosato
- 5 EMB** Etambutol
- 6 ETH** Etionamida
- 7 GLP** Glicopeptidolípidos
- 8 INH** Isoniacida
- 9 LAM** Lipoarabinomanana
- 10 LOS** Lipooligosacáridos
- 11 ManLAM** LAM manosilada
- 12 MDR** Multi droga resistente
- 13 CIM** Concentración inhibitoria mínima

**14 MTB *Mycobacterium tuberculosis***

**15 NAD Nicotinamida adenina dinucleótido**

**16 NAG N acetil glucosamina**

**17 NAM N acetilmurámico**

**18 ORFs Open Reading Frame**

**19 PAS Ácido paraminosalicílico**

**20 PE Motivos Prolina – Ácido Glutámico**

**21 PPE Prolina – Prolina – Ácido Glutámico**

**22 PG Peptidoglicano**

**23 PGL Fenoglicolipidos**

**24 PGRSs Secuencias polimórficas ricas en G+C**

**25 PILAM LAMs cubiertos con fosfoinositol**

**26 PIM Fosfatidilinositolmanósidos**

**27 PZA Piracínamida**

**28 RIF Rifampicina**

**29 STR Estreptomicina**

**30 TB Tuberculosis**

**31 TB MDR Tuberculosis Multi droga resistente**

**32 TDM Trehalosa dミcolato**

## **RESUMEN**

**Tuberculosis multidroga resistente (TB MDR)** se define como la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los dos principales fármacos del tratamiento antifímico de primera linea, Isoniacida y Rifampicina TB MDR representa una amenaza al control global de la TB ya que para su tratamiento se utilizan fármacos de segunda linea, los cuales son menos efectivos más caros y más tóxicos Por lo tanto un diagnóstico rápido y la prevención de la TB MDR en la comunidad es indispensable

Actualmente se han logrado grandes avances tecnologicos en el desarrollo de pruebas moleculares rápidas para el diagnóstico oportuno de TB MDR debido a que existe una mejor comprensión de los mecanismos genéticos de drogo resistencia en *M. tuberculosis* Una de las grandes ventajas de utilizar pruebas moleculares en la detección de resistencia es que acorta el tiempo de diagnóstico significativamente lo que hace posible打断 la cadena de transmisión de manera oportuna

Polimorfismos de nucleótido simple es la principal causa de drogo resistencia y a nivel mundial se han descrito las mutaciones más comunes que confieren resistencia a los principales farmacos antifírmicos

Aunque la frecuencia de mutaciones genéticas individuales que confieren resistencia ha sido reportada en algunos países de América, no encontramos

**al momento de la realización de nuestro estudio publicaciones similares en América Central**

**El principal objetivo de este estudio es identificar las mutaciones presentes en una colección de aislados TB MDR recolectados durante los años 2001 2011 en el Departamento de Micobacteriología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud Para ello secuenciamos los aislados TB MDR y a la vez evaluamos la capacidad de una técnica molecular denominada reacción en cadena de la polimerasa multiple alelo específico en la detección de resistencia debido a que es una técnica económica y rápida utilizada en países con alta carga de TB MDR**

**Los resultados obtenidos en este estudio nos permitirán tener una mejor comprensión de la tuberculosis resistente que circula en nuestro país (dada su posición geográfica como ruta de tránsito) y a la vez servirán como base en la elección de una técnica molecular capaz de detectar la mayor cantidad de mutaciones prevalentes en nuestro país**

## **INTRODUCCION**

**La tuberculosis multídrga resistente (TB MDR) se define como aquel caso donde el paciente excreta bacilos resistentes a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF)<sup>(2)</sup>** Actualmente constituye un problema importante para los responsables del control de la tuberculosis (TB) en muchos países La TB MDR se propaga de persona a persona, lo que se conoce como resistencia primaria y esto podría resultar en una epidemia de TB con opciones terapéuticas restringidas La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año 424 000 personas adquieren TB MDR, una forma de TB que no responde al tratamiento estándar<sup>(2)</sup>

En el 2010 se estimaron unos 6 200 casos de TB MDR entre los casos de TB notificados en la región de las Américas Siete países representaron más de 80% de los casos de TB MDR en la región (Perú, Brasil México Ecuador Haití República Dominicana y Colombia)<sup>(1)</sup>

Datos del 2007 de la OMS demuestran que en Panamá la TB MDR representa 1 5% de los casos nuevos y 9 7% de los casos previamente tratados

**Ante esta realidad los esfuerzos por reducir el tiempo de detección de los casos TB MDR adquieren a nivel mundial y local gran importancia El manejo de la TB MDR se centra en la expansión de las medidas de control de la TB MDR (capacitación guías) a nivel de país la cobertura de la prueba de sensibilidad a medicamentos la detección de casos de TB MDR y el tratamiento de segunda linea**

**En Panamá la detección de estos casos la realiza de manera normativa y operacional la sección de Micobacteriología del Laboratorio Central de Referencia de Salud Pública del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (LCRSP ICGES) El método utilizado es el método estándar de las proporciones multiples de Canetti Rist y Grossel, método que emplea medios de cultivos convencionales que requieren de largos periodos de incubación <sup>(130)</sup>**

**En comunicado de prensa de la OMS en el 2010 en materia de reforzamiento de los laboratorios se notificó que es necesario ampliar y acelerar urgentemente en los países el acceso a tecnologías nuevas y rápidas que puedan diagnosticar la TB MDR en dos días en lugar de los métodos tradicionales que llegan a tardar hasta cuatro meses <sup>(2)</sup>**

**Con la finalidad de ampliar y fortalecer los conocimientos en materia de TB MDR a nivel nacional nos proponemos en este trabajo identificar las mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a rifampicina e isoniacida mediante la secuenciación de los genes *rpoB* *katG* *inhA* e *inhA* *mabA* respectivamente. La información generada permitirá determinar las mutaciones presentes en las cepas resistentes de tuberculosis que circulan en nuestro país y su frecuencia.**

**Una vez identificadas las mutaciones más frecuentes se evaluará la utilización de la Reacción en cadena de la polimerasa múltiple alelo específico (PCRMAS) en la detección de las mutaciones que circulan en nuestro país**

## **OBJETIVO GENERAL**

**Identificar las mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a rifampicina e isoniacida en una colección de cepas de tuberculosis multidroga resistente de Panamá que data de los años 2001 - 2011**

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Amplificar los genes *katG* *inhA* *inhA maba* y *rpoB* involucrados en la resistencia a isoniacida y rifampicina, respectivamente**
  
- 2 Secuenciar los productos de amplificación de los genes *katG* *inhA* *inhA maba* y *rpoB* Reconocer en las secuencias dónde se presentan los cambios**
  
- 3 Comparar los resultados obtenidos con la prueba PCRMAS con los obtenidos por el método de referencia**

## **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

### **1 GENERALIDADES DE *Mycobacterium tuberculosis***

#### **1 1 Descubrimiento de *Mycobacterium tuberculosis***

Robert Koch medico y científico aleman presentó el 24 de Marzo de 1882 su descubrimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) agente causal de la enfermedad conocida como tuberculosis (TB) Koch comenzó recordando a la audiencia de las estadísticas aterradoras Si la importancia de una enfermedad para la humanidad se mide por el numero de muertes que provoca, la TB debe ser considerada mucho más importante que las enfermedades infecciosas más temidas la peste el cólera y similares Uno de cada siete de todos los seres humanos muere de TB Y si sólo se tiene en cuenta a los grupos de mediana edad productiva, la tuberculosis representa mucho más de un tercio <sup>(3)</sup> La conferencia de Koch considerada por muchos como la más importante en la historia clínica, era tan innovadora, inspiradora y profunda, que sentó las bases para los procedimientos científicos del siglo XX Él describió cómo había inventado un nuevo método de tinción y lo demostró durante la audiencia Koch llevó todo su laboratorio a la sala de conferencias microscopios tubos de ensayo con cultivos portaobjetos de vidrio con bacterias teñidas colorantes reactivos frascos de vidrio con las muestras de tejido etc Él quería que la audiencia

revisara por si misma sus conclusiones Koch mostró disecciones de tejidos de los conejillos de indias que fueron infectados tambien de pulmones de monos infectados de cerebro y pulmones de seres humanos que habian muerto de TB de las lesiones en los pulmones de los pacientes con infección crónica y de las cavidades del abdomen de ganado infectado con TB En todos los casos la enfermedad que se habia desarrollado en los conejillos de indias infectados experimentalmente era la misma, y los cultivos de bacterias tomadas de los conejillos de indias infectados eran idénticos El publico se quedó atónito Poco a poco la gente se levanto y comenzó a buscar en los microscopios para ver las bacterias de la TB con sus propios ojos

Un año antes el 18 de Agosto de 1881 en su laboratorio durante una tinción con azul de metíleno (de material procedente de tubérculos recién formados) Koch descubrió unas estructuras de forma alargada, que no podía ver si no aplicaba ese colorante Para mejorar el contraste decidió añadir marrón de Bismarck, descubriendo que las estructuras se volvían brillantes y transparentes Y mejoró la técnica empleando álcali hasta determinar la concentración idónea para la visualización de los bastones Koch había dado con la combinación que permitía teñir la película cubierta del bacilo de la TB una mezcla de fucsina y anilina, cuyas propiedades básicas permitían visualizar al microorganismo

Mas tarde en Alemania Franz Ziehl y Friedrich Neelsen mejoran el método de tinción para MTB y a partir de entonces se conocerá como la Tinción de Ziehl Neelsen <sup>(3)</sup>

## **1 2 Características morfológicas y taxonomía de *Mycobacterium tuberculosis***

*Mycobacterium tuberculosis* tiene un tamaño de 0,2 a 0,6 x 1 a 10 micras alcohol ácido resistente (BAAR) frecuentemente incolora y aeróbica estricta Su crecimiento está subordinado a presencia de oxígeno y al pH circundante Es muy resistente al frío congelación y desecación Es muy sensible al calor luz solar y luz ultravioleta Su multiplicación es muy lenta Se divide cada 16 a 20 horas Ante circunstancias adversas puede entrar en estado latente y retrasar su multiplicación por algunos días hasta varios años El reservorio natural de MTB es el ser humano tanto el sano infectado como el enfermo

La enfermedad se puede manifestar en cualquier órgano del cuerpo Lo más frecuente es la infección en los pulmones y puede propagarse a otros órganos por vía sanguínea o linfática <sup>(4)</sup>

Las micobacterias pertenecen al orden de los actinomicetales (bacterias con formas de hongos) y son consideradas formas de transición entre las eubacterias (bacterias verdaderas) y los hongos (Cuadro 1)

**Cuadro 1**  
**Clasificación segun el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**

Dominio	Bacteria
Phylum	Filum BXIV Actinobacteria
Clase	Actinobacteria
Sub Clase	Actinomycetidae
Orden	Actinomycetales
Sub orden	Corynebacterineae
Familia	Mycobacteriaceae
Género	Mycobacterium
Especie	Tuberculosis

En 1950 Timpe y Runyon propusieron una clasificación útil del género *Mycobacterium* en cuatro grupos que se basaba en la velocidad de crecimiento (rápido o lento según sea superior o inferior a una semana) producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno escotocromógeno y no cromógeno) y características coloniales. En el Cuadro 2 se presenta la clasificación modificada de Runyon que incluye los miembros del género *Mycobacterium* <sup>(5)</sup>

## Cuadro 2

### Clasificación de micobacterias que causan frecuentemente infecciones en humanos (Runyon 1959)

#### *M. tuberculosis* complex

*M. tuberculosis*

*M. bovis*

*M. africanum*

#### *M. leprae*

Micobacterias de crecimiento lento (más de 7 días)

*M. kansasi* (fotocromógenos grupo I de Runyon)

*M. marinum*

*M. scrofulaceum* (escoliocromógenos grupo II)

*M. scrofulaceum*

*M. avium* complex (no cromógenos grupo III)

*M. avium*

*M. intracellulare*

*M. scrofulaceum*

#### *M. terrae* complex

*M. ulcerans*

*M. xenopi*

Micobacterias de crecimiento rápido (grupo IV de Runyon)

*M. fortuitum*

*M. chelonae*

*M. abscessus*

Runyon EH. Annu Rev Med. 1959; 13: 273-301. Traducción: C. R. Griffith y W. J. Walker.

Actualmente el género *Mycobacterium* incluye más de cien especies divididas para fines didácticos en tres grupos complejo tuberculosis complejo lepra y otras micobacterias <sup>(6)</sup>

#### • Complejo tuberculosis

El complejo tuberculosis está conformado por las especies que causan la enfermedad de TB en humanos y en animales *Mycobacterium tuberculosis* *M. microti* *M. africanum* *M. bovis* *M. canetti* *M. caprae* *M. pinnipedii*

*M mungi* *M orygis* (Cuadro 3) *M tuberculosis* es la especie más frecuentemente aislada en humanos <sup>(6)</sup> Estudios de homología muestran que todas las especies que conforman el complejo tuberculosis tienen una similitud del 95-100% en su ADN

#### *Mycobacterium tuberculosis*

Es la bacteria responsable de la mayor cantidad de casos de TB en el mundo Descrita por primera vez el 24 de Marzo de 1882 por Robert Koch El reservorio natural de *M tuberculosis* es el ser humano tanto el sano infectado como el enfermo Puede causar enfermedad en cualquier órgano del cuerpo siendo la infección en los pulmones la más frecuente De allí por vía sanguínea o linfática se propaga a otros órganos

#### *Mycobacterium microti*

Los reservorios naturales de esta bacteria son pequeños roedores gatos y otros mamíferos domésticos Es de muy lento crecimiento En humanos se han reportado casos de enfermedad pulmonar ganglionar abdominal y meníngea Se ha usado como modelo para investigar posibles vacunas contra la TB

***Mycobacterium africanum***

**Responsable de más del 50% de los casos con baciloscopia positiva en África Occidental La enfermedad producida por *M. africanum* no se diferencia clínicamente de la causada por *M. tuberculosis***

***Mycobacterium bovis***

**Es prácticamente indiferenciable de *M. tuberculosis* La forma de transmisión puede ser la habitual entre humanos pero en general se produce por el consumo de productos animales contaminados o contacto con animales enfermos La enfermedad clínicamente es idéntica a la causada por *M. tuberculosis***

**La vacuna Bacillus de Calmette y Guérin (BCG) contra la TB se prepara a partir de extracto atenuado de *Mycobacterium bovis* que ha perdido su virulencia, manteniendo su poder antigénico**

***Mycobacterium canetti***

**Los casos de TB producidos por esta especie son de África y la presentación es usualmente pulmonar**

***Mycobacterium caprae***

**Aislada en 1999 de cabras con enfermedad tuberculosa diseminada Se ha encontrado también en cerdos salvajes y vacas**

*Mycobacterium pinnipedu*

Se considera a los pinnípedos como su hospedero natural pero también produce enfermedad en roedores tigres vacas y en el humano La vía de transmisión parece ser la aérea La presentación de la enfermedad es diversa pudiendo afectar un área o ser diseminada Se ha descrito zoonosis desde lobos marinos a humanos

*Mycobacterium mungi*

Fue descrita en el 2010 en suricatos africanos en quienes la enfermedad afecta el tracto respiratorio superior Aun no se conoce con exactitud su ciclo biológico y forma de transmisión

*Mycobacterium orygis*

Aislada en humanos al sur y sudeste asiático Siendo un agente causal de TB en oryxes gacelas antílopes vacas monos Rhesus al sur de Asia y seres humanos

**Cuadro 3**  
**Complejo *Mycobacterium tuberculosis***

Bacterias del complejo	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Koch 1882
<i>Mycobacterium microti</i>	Wells 1937
<i>Mycobacterium africanum</i>	Castets 1968
<i>Mycobacterium bovis</i>	Lessel & Karlson 1970
<i>Mycobacterium canetti</i>	vanSoolingen 1997
<i>Mycobacterium caprae</i>	Aranaz 1999
<i>Mycobacterium pinnipedii</i>	Cousins 2003
<i>Mycobacterium mungi</i>	Alexander 2010
<i>Mycobacterium orygis</i>	vanIngen 2012

• **Complejo lepra**

En este complejo se incluye la especie *M. leprae* productor de la lepra humana Conocida también como el *bacilo de Hansen* Fue descubierta en 1874 por Gerhard Armauer Hansen Es intracelular y pleomórfica, aunque usualmente tiene forma de bastón <sup>(6)</sup>

• **Otras micobacterias**

En este grupo encontramos las micobacterias atípicas o ambientales que están ampliamente distribuidas en el medio ambiente fundamentalmente en el agua y en la tierra, sus principales reservorios La transmisión persona a

persona es rara, en la afección respiratoria el mecanismo de transmisión más aceptado son los aerosoles en el medio ambiente y la ingesta por vía digestiva Durante muchos años la descripción de estas enfermedades producidas por micobacterias ambientales denominadas en su conjunto micobacteriosis era un hecho ocasional y casi anecdótico la gran mayoría de las veces ligado a situaciones de inmunodeficiencia. Sin embargo en los últimos años ha pasado a ser una patología relativamente frecuente sobre todo condicionada a la aparición de la epidemia de SIDA lo que ha conllevado un incremento paralelo en la investigación y conocimientos de estas micobacterias <sup>(6)</sup>

### **1.3 Componentes de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* y su rol en la immunopatogénesis**

La envoltura de MTB es compleja, constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática <sup>(7)</sup> La cápsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias y sirve de protección contra múltiples factores externos Por tanto tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmune <sup>(8)</sup> Sus características y composición varían en las diferentes especies y cepas de micobacterias Entre los principales componentes se encuentran el ácido micólico y glicolípidos Estos glicolípidos junto con algunas proteínas son responsables de las características antigénicas de la bacteria <sup>(7,9)</sup>

La pared micobacteriana se localiza por debajo de la cápsula separada por un espacio periplásmico posee un elevado contenido en lípidos (50-60%) que le confieren un carácter hidrofóbico y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática <sup>(10)</sup> Es una efectiva barrera frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales y está constituida por el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos arabinogalactano peptidoglucano (mAGP) <sup>(11)</sup> Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos de gran importancia taxonómica para micobacterias y bacterias de géneros relacionados como Nocardia y Cornebacterium en el caso de las micobacterias los ácidos micólicos tienen de 70 80 carbonos y se les atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura <sup>(9)</sup>

La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como la lipoarabinomanana (LAM) que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la TB <sup>(7)</sup>

### 1.3 1 Componentes estructurales

Las micobacterias presentan una gran diversidad de estructuras glicosiladas complejas con enlace de tipo O glicosídico Algunos de estos glicoconjungados son de importancia estructural como el peptidoglicano (PG)

y los polisacáridos El PG es una molécula estructural mientras que los polisacáridos protegen a la bacteria de la lisis por el complemento <sup>(12)</sup>

Los componentes mayoritarios de la envoltura de las micobacterias son lipidos asociados a carbohidratos (glicolipidos) fosfolípidos glicosilados o carbohidratos complejos sustituidos con ácido micólico o péptidos Las porciones glicosiladas de estas moléculas son importantes en la interacción con los componentes de la respuesta inmune innata y específica del hospedero <sup>(13)</sup>

Se estima que el 25% del peso seco de las micobacterias corresponde a lipidos o glicolipidos el 40% de ellos son moléculas de ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa, que es un disacárido de α D glucosa formado por residuos de α D gluco piranosil (1 → 1)–α glucopiranosa La trehalosa es un antígeno presente en numerosas moléculas de micobacterias y existen varias moléculas que contienen este disacárido las cuales se clasifican en micolatos de trehalosa y sulfolípidos de trehalosa <sup>(14)</sup>

Los *micolatos de trehalosa* son ácidos micólicos unidos a una trehalosa, cuando están acetilados constituyen parte de la trehalosa dimicrolato (TDM) o factor cuerda o parte del fíbricerol dimicocerosato (DIM) <sup>(14)</sup>

*El factor cuerda (trehalosa 6 6 – dimicrolato)* es una molécula mixta que se encuentra en la capa periférica de la envoltura Es abundante en todas las micobacterias patógenas Recibe ese nombre porque en los cultivos los

microorganismos forman agregados semejantes a cordones Esta molécula presenta pequeñas variaciones en ciertos grupos químicos las que son características en las diversas especies de micobacterias y cepas <sup>(15)</sup> El factor cuerda está formado por un conjunto de tres macromoléculas peptidoglicano (PG) arabinogalactano (AG) y micolatos En condiciones normales el factor cuerda estimula la actividad de la enzima que hidroliza el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADasa) en el hospedero lo que trae como consecuencia la disminución en la cantidad de la coenzima NAD <sup>(16)</sup> Esta coenzima es común en las reacciones catabólicas de óxido reducción y la ausencia de NAD interrumpe la cadena respiratoria en la mitocondria El factor cuerda es inmunogénico y se ha intentado usarlo en la prevención de la tuberculosis <sup>(16, 17)</sup> además su naturaleza química favorece la inflamación crónica y ocasiona la formación de granulomas en el pulmón <sup>(18)</sup> La formación del granuloma es producto de una serie de mecanismos de la respuesta inmune que da por resultado una activación y diferenciación de los macrófagos mediada principalmente por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) conteniendo la diseminación de la bacteria <sup>(19)</sup> El factor cuerda también se ha asociado a la inhibición de la fusión de los lisosomas con los fagosomas en los macrófagos fenómeno que se considera clave para la supervivencia de *M. tuberculosis* en estas células <sup>(8)</sup>

*Fthicerol dimicocerosato (DIM)* es una molécula que contiene trehalosa, es un ácido graso de 35 carbonos y tiene sustituciones con grupos metilos y dos ácidos grasos (ácidos micocerósidos) Esta molécula es característica de las cepas patógenas y forma una barrera que impide la permeabilidad de la envoltura de las micobacterias <sup>(10)</sup>

Los *sulfolípidos de trehalosa (SL)* son llamados tambien sulfatídos son ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa, pero sustituidos por grupos sulfatos y se localizan en la periferia de la pared celular y parecen ser factores de virulencia En *Mycobacterium tuberculosis* estos sulfolípidos de trehalosa funcionan como evasinas es decir moléculas que facilitan que la bacteria escape a la acción de los macrófagos inhibiendo la fusión del fagosoma con el lisosoma, lo cual puede explicar el éxito como parásitos intracelulares <sup>(9 10)</sup> Los sulfolípidos son responsables de las características de tinción de las micobacterias <sup>(9)</sup> y se unen a los receptores "basurero" de clase A (ScR) o receptores scavenger en macrófagos lo que favorece la entrada de la bacteria a la celula hospedera. <sup>(10)</sup> Además evita la maduración del fagosoma del macrófago cuando está infectado por la micobacteria porque inhiben a la proteína C cinasa (PKT) <sup>(8)</sup> y como consecuencia de esto también se ve inhibida la producción de óxido nítrico y de citosinas pro inflamatorias <sup>(20 21)</sup>

**Los glicolípidos con trehalosas acetiladas** son abundantes en la cápsula de las micobacterias y se clasifican en fenoglicolípidos (PGL) glicopeptidolípidos (GLP) y lipooligosacáridos (LOS)<sup>(10)</sup>

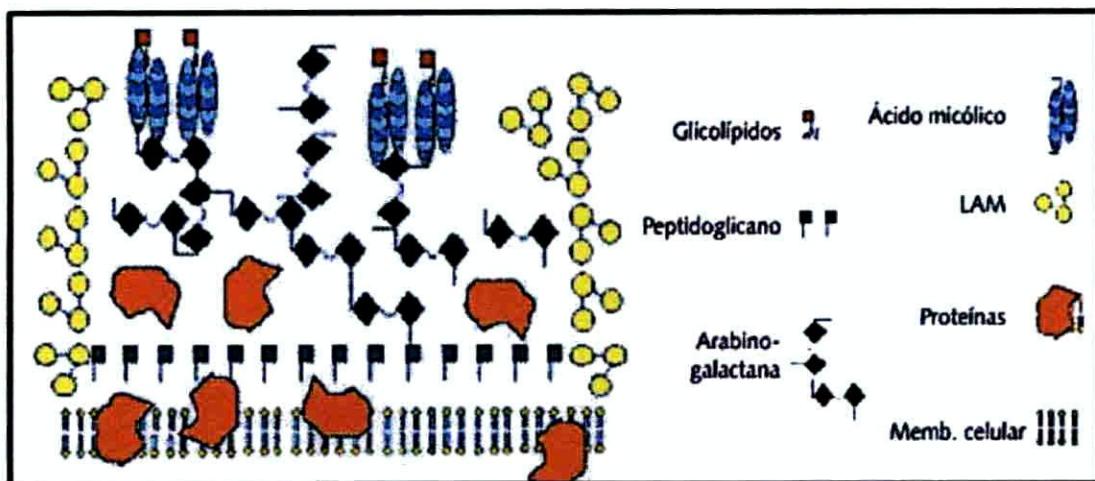
El PGL tiene una porción sacáridica altamente inmunogénica y está presente en las cepas patógenas de micobacterias. Estas moléculas le proporcionan propiedades antigénicas en la cápsula de *M. tuberculosis* y se asocian con la patogénesis de la TB razón por la que se utilizan en el serodiagnóstico de la enfermedad<sup>(18 22)</sup>

Los GLP son antígenos muy abundantes en la cápsula, presentan diferencias antigenicas entre especies de micobacterias. Están compuestas por moléculas de fenol tiocerol esterificado con dos ácidos grasos multirrámificados (micocerósico o tioceránico) y a diferencia de todos los anteriores los residuos sacáridicos están O metilados y asociados a la morfología lisa de algunas cepas de micobacterias y tienen un papel importante en la supervivencia intracelular de las micobacterias. Se ha observado *in vivo e in vitro* que los GLP inhiben la proliferación de células mononucleares estimuladas con mitógenos<sup>(18)</sup>

Los lipooligosacáridos (LOS) son aquellos constituidos por ácidos grasos de cadena larga con un núcleo sacárido de poliacil trehalosa y un alto contenido de manosa. La cantidad y tipo de residuos de carbohidratos dan lugar a una variedad de LOS capsulares con diferencias antigenicas<sup>(10)</sup>

Estas diferencias en los residuos sacáridicos tienen valor taxonómico y diagnóstico.<sup>(17)</sup>

**Figura 1**  
**Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis***



Tomado de Gorocica P y cols. <sup>(13)</sup>

### 1.3.1.1 Componentes con alto contenido de Manosa

*Lipoarabinomanana (LAM)* es un factor de virulencia lipoglycan e importante en la bacteria del género *Mycobacterium*. Además de servir como un importante componente de la pared celular, se piensa sirve como una modulina con efectos inmunorreguladores y anti-inflamatorios. Esto permite mantener la supervivencia de la bacteria en el reservorio humano al socavar la resistencia del huésped y la respuesta inmune adquirida. Las funciones adicionales de *LAM* se cree que incluyen la neutralización de los radicales libres de oxígeno citotóxicos producidos por los macrófagos, la

inhibición de la proteína quinasa C y la inducción de genes de respuesta temprana (23)

*LAM* se sintetiza mediante la adición de residuos de manosa a fosfonositol por una serie de manosiltransferasas para producir fosfatidilinositolmanósidos (PIM) y lipomannan (LM). PIM y LM son entonces glicosilados con arabinano para formar LAM. LAM se sabe tiene tres dominios estructurales principales. Estos incluyen un anclaje de glicosilfosfatidil que une la molécula a la pared celular un nucleo D manano que sirve como un esqueleto de hidratos de carbono y un terminal D arabinano. Muchas cadenas laterales arabinofuranosil ramifican el nucleo de manosa. Las modificaciones covalentes a este terminal D arabinano crea, diversas estructuras LAM con sus propias funciones únicas para mediar la supervivencia bacteriana dentro de un huésped. La presencia y la estructura de la nivelación permiten una clasificación de moléculas de LAM en tres clases principales ManLAM PILAM y AraLAM (23)

*LAM manosilada (ManLAM)* se caracteriza por la presencia de tapones manosilo en el terminal D arabinano. Estos tipos de modelos de área limitada se encuentran más comúnmente en más especies patógenas tales como *Mycobacterium tuberculosis* *M leprae* y *M bovis*. ManLAM ha demostrado ser una molécula antiinflamatoria que inhibe la producción de TNF a e IL 12 por las células dendríticas y macrófagos humanos *in vitro*.

para modular la apoptosis inducida por macrófagos mediante la unión a receptores de manosa. (23)

*PILAM* son LAMs cubiertos con fosfoinositol y se encuentran típicamente en las especies no patógenas como *M smegmatis*. En contraste con ManLAMs PILAMs son pro inflamatorias. CD14 un receptor presente en el reconocimiento por macrófagos asociado con Toll like receptor 2 se describe como un receptor para PILAM. La unión de PILAM al receptor provoca la activación de una cascada de señalización intracelular que activa los factores de transcripción que inicien la transcripción de genes de citoquinas proinflamatorias. Induciendo a TNF α, IL 8, IL 12 y la activación y apoptosis de los macrófagos. (23)

*AraLAM* se caracteriza por cadenas laterales 1 3 manosilo en lugar de la 1 2 que se encuentra comúnmente en otras especies de micobacterias. Ciertas especies de bacterias de crecimiento rápido como *M chelonae* y cepas de laboratorio contienen modelos de área limitada que están ausentes de las dos capas de manosa y phosphoinositol. Estas formas se consideran más potentes que la ManLAM manosa-capsulado en la inducción de las funciones asociadas con la activación de macrófagos. Además de la estimulación de los genes tempranos tales como c-fos, KC y JE, AraLAM induce la transcripción del ARNm para citoquinas characteristicamente producidos por los macrófagos. Proto oncogenes c-fos y c-myc están involucrados en la

regulación de la transcripción génica, mientras que JE y KC son citoquinas peptídicos que sirven como quimioatractantes específicos para los neutrófilos y los monocitos. La activación de TNF a crea manifestaciones patológicas de la enfermedad, tales como la necrosis del tejido daño a los nervios y la inmunidad protectora. Grupos O acilo de la fracción de arabinomanano pueden ser responsables de la actividad de TNF inductor que causa los síntomas de fiebre pérdida de peso y necrosis. Sin embargo la presencia de ManLAMs disminuye la actividad de AraLAM y la supresión de una respuesta inmune.<sup>(23)</sup>

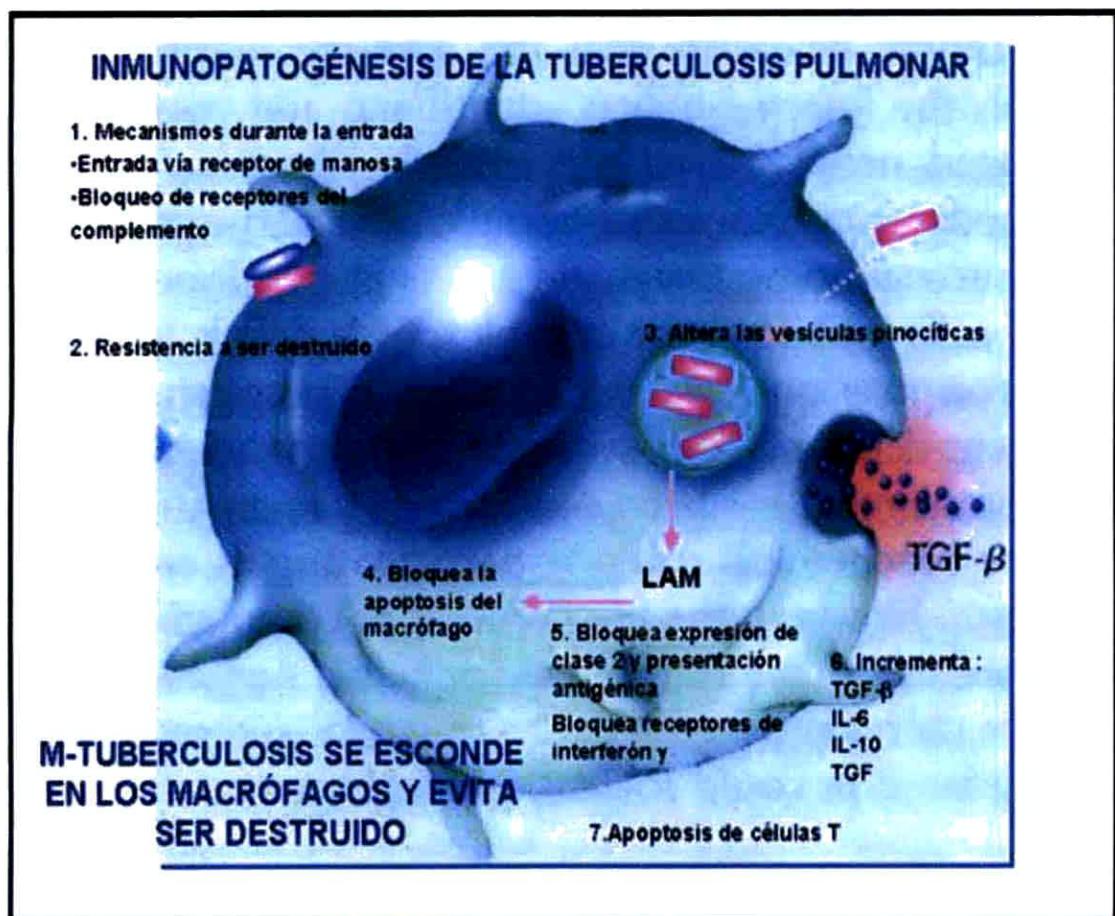
### **1 3 1 2 Componentes ricos en Arabinosa y Galactosa**

El *disacárido arabinogalactana (AG)* es un antígeno presente en varias macromoléculas de bacterias taxonómicamente relacionadas. En las bacterias del orden de los actinomicetales como las mucobacterias representa cerca del 35% de la composición de la pared celular.<sup>(24)</sup> AG está compuesta por los azúcares D galactofuranosa y D arabinofuranosa, que son raros en la naturaleza.

El *peptidoglicano (PG)* es una capa rígida que confiere resistencia a la presión osmótica interna y actúa de soporte para otras moléculas de la pared celular. El PG está compuesto al igual que en otras bacterias por unidades de N acetil glucosamina (NAG) y de N acetilmurámico (NAM) aunque presenta gran cantidad de residuos de N glicolil murámico. Los residuos de

NAM están unidos a una cadena peptídica formada por alanina (Ala), glutámico (Glu) y ácido meso-diaminopimélico (DAP) (L-Ala-D-Glu-DPA-D-Ala). Los enlaces interpeptídicos más frecuentes se dan entre DAP y D-Ala. Algunas enzimas que participan en la biosíntesis del complejo se han inhibido con fármacos como la fosfomicina. El estudio de estas enzimas es importante para el desarrollo de nuevos fármacos contra micobacterias.

**Figura 2**  
**Inmunopatogénesis de la Tuberculosis pulmonar**



Tomado del V Congreso virtual Hispanoamericano de anatomía patológica. (<http://conganat.uninet.edu/conferencias/C013/>)

#### 1.4 Genoma de *Mycobacterium tuberculosis*

En 1998 se publicó el genoma completo de MTB concretamente de la cepa de laboratorio H37Rv. El genoma posee 4 411529 pares de bases que incluyen genes de la virulencia, patogénesis, supervivencia, latencia y posibles genes dianas para la acción de fármacos.<sup>(25)</sup>

Se estima que el genoma de MTB tiene un contenido importante en citosina/guanina (65.5%) relativamente constante a lo largo de toda la secuencia, alberga alrededor de 4000 genes (3924 ORFs identificados). Llama la atención la elevada proporción de genes que codifican para la expresión de enzimas implicadas en lipogénesis y lipólisis. De hecho pocas bacterias son capaces de sintetizar una gama de moléculas lipofílicas tan variada como MTB y destaca el hecho de que el genoma codifique incluso para sistemas enzimáticos de biosíntesis lipídica propios de plantas y de mamíferos. Si se compara el número de enzimas implicados en el metabolismo de los ácidos grasos de *E. coli* versus MTB contrasta los 50 de *E. coli* frente a los 250 genes de MTB. Es importante destacar que la mayor parte de los genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos están destinados a la lipólisis más que a la lipogénesis. En efecto la degradación de lípidos propios de las membranas celulares o vacuolares del huésped, resulta decisiva para la patogenia, así como para la obtención de energía.<sup>(25)</sup>

El hecho de que la proporción C/G sea elevada a lo largo de todo el genoma, en forma homogénea y no concentrada en regiones puntuales denota que se trata de un genoma que no ha recibido el impacto de la transferencia horizontal de islas de patogenia. No obstante se observan regiones con una proporción de C/G superior a la media y que son secuencias pertenecientes a una gran familia de genes que incluyen PGRSs (polymorphic G+C rich sequences) (25)

Por otro lado el genoma de MTB difiere del resto de las bacterias por poseer dos nuevas familias de proteínas ricas en glicina, cuya estructura repetitiva proporciona una fuente importante de variabilidad antigénica. Se calcula que un 10% de la capacidad codificante de MTB está destinada a esta familia multigénica, cuyos genes se hallan organizados en forma de *cluster*. Es un genoma rico en ADN repetitivo especialmente en forma de secuencias de inserción como la *IS6110* de la que se han hallado 16 copias pero también son fuentes de repetición las nuevas familias multigénicas y genes *housekeeping* duplicados. Pese a que la tasa de duplicación es similar a la de otros microorganismos (el 51% de sus secuencias codificantes han surgido a partir de un proceso de duplicación) como *E. coli* o *B. subtilis* difiere respecto a ellos en el hecho de que el grado de conservación es considerablemente superior es decir al proceso de duplicación no le ha seguido un fenómeno de divergencia, lo cual constituye una evidencia más

que confirma la hipótesis de que *M. tuberculosis* ha surgido de un proceso de especiación relativamente reciente o bien que se halla ante un cuello de botella.

Los 3924 ORFs identificados suponen un 91% de capacidad codificante del genoma, esto es una densidad alta. El 40% de los ORFs predichos se les ha atribuido una función precisa por comparación con secuencias depositadas en bases de datos en Genbank. Un 44% son secuencias con similitud o información relacionada. El 16% restante alberga genes de función desconocida, entre los que se deben encontrar genes con funciones específicas de *Mycobacterium*.<sup>(25)</sup>

En cuanto a la composición aminoacídica, los datos guardan coherencia con el contenido elevado en guanina/citosina, en efecto predominan aminoácidos del tipo alanina, glicina, prolina, arginina y triptófano puesto que son los codificados por codones ricos en G/C frente a unos aminoácidos menos representados como son la asparagina, isoleucina, lisina, fenilalanina y tirosina.<sup>(25)</sup>

Dos nuevas familias de proteínas las PE (motivos Pro Glu a nivel del extremo N terminal) y las PPE (Pro Pro-Glu) se caracterizan precisamente por ser ricas en glicina, y su elevado grado de polimorfismo hace pensar en ellas como potenciales antígenos. El hecho de que se les atribuya un papel

inmunológico no sólo se debe a la importante fuente de variación (antigénica) que suponen sino porque se cree que podrían interferir en la respuesta inmune vía inhibición del procesamiento antigénico tan necesario para la presentación de antígeno posterior (25)

La familia PE por ejemplo se compone de 90 miembros que comparten un dominio en el extremo N terminal muy conservado consistente en 110 residuos aminoacídicos que se disponen dando lugar a una estructura globular mientras que el extremo C terminal varía en secuencia, longitud y número de repeticiones. Estudios filogenéticos han llevado a subdividir la familia en distintos grupos siendo el más numeroso el de las PGRS cuyo contenido en glicina supera el 50% y se distribuye en forma de repeticiones en tandem del motivo Gly Gly Ala/Asn. Existe cierto paralelismo entre las proteínas PGRS y los antígenos del virus nuclear Epstein Barr (EBNAs). Los EBNAs actúan bloqueando la acción del proteosoma, impidiendo así la presentación de antígenos de clase I (25)

Al completar la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* se abre una prometedora puerta que nos permite pensar en nuevos tratamientos a la hora de luchar contra la epidemia emergente de la que son responsables un número cada vez mayor de cepas multiresistentes (25)

## **2 PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS**

**El contagio con MTB se produce habitualmente por vía aerógena a partir de pacientes bacilíferos con lesiones pulmonares Al toser se generan aerosoles de pequeñas partículas líquidas en cuyo interior se encierran uno o dos bacilos Al evaporarse queda tan sólo el núcleo de bacilos que permanece flotando en el medio ambiente y se desplaza con las corrientes de aire pudiendo ser aspirado por otras personas Las partículas de tamaño superior a  $10\mu\text{m}$  quedan retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar pero las de menor tamaño (entre 1 y  $5\mu\text{m}$ ) tienen la capacidad de llegar hasta los alvéolos y desencadena la primoinfección <sup>(26)</sup>**

**Otras posibles vías de contagio han dejado de tener importancia epidemiológica. Tal es el caso de la transmisión digestiva por la leche de vacas enfermas (*Mycobacterium bovis*) controlada gracias al procedimiento de pasteurización sistemático de la leche**

**En la mayoría de las ocasiones los escasos bacilos que llegan hasta los alveolos son fagocitados y destruidos por los macrófagos Sólo un pequeño porcentaje de las personas infectadas (aproximadamente el 10%) llegará a desarrollar la enfermedad la mitad de ellos tempranamente a los pocos meses de la infección mientras que el otro 5% necesitará de un largo intervalo (a veces de varias décadas) para que se produzca la reactivación**

endógena de lesiones aparentemente curadas que albergan en su interior micobacterias en condiciones metabólicas adversas pero potencialmente viables <sup>(26)</sup>

La aspiración de *M tuberculosis* hasta los alveolos desencadena una serie de respuestas tisulares e inmunológicas conocidas como primoinfección tuberculosa. En primer lugar se produce un foco de alveolitis exudativa los macrófagos eliminan un determinado numero de micobacterias y si la invasión no ha sido masiva, muchas veces no se pasa esta fase local. Cuando la infección se propaga por las vías linfáticas intrapulmonares hasta los ganglios regionales paratraqueales o mediastínicos da lugar al llamado complejo bipolar (foco pulmonar y adenopatías). En esta fase es habitual que se produzcan pequeñas diseminaciones bacilares por vía hematogena a los segmentos apicales pulmonares riñones hígado y huesos que por lo general suelen controlarse localmente y que no tienen trascendencia clínica alguna.

En las 2-10 semanas posteriores a la infección se pone en marcha una respuesta inmunológica celular desencadenada por los antígenos de la membrana y del citoplasma de las micobacterias. Los macrófagos reconocen y procesan dichos antígenos y los muestran a los linfocitos T para que estimulen mediante liberación de linfocinas la transformación de un gran numero de macrófagos en células que están altamente especializadas en la lucha contra las micobacterias (células epiteliales y gigantes de Langhans).

**Los linfocitos activadores de los macrófagos las células epiteloides y las gigantes se sitúan concéntricamente para rodear e intentar destruir a los bacilos intrusos dando lugar al característico granuloma tuberculoso que al cabo de un tiempo se reblandece en su centro y deja un núcleo de necrosis caseosa En muchos casos este sistema defensivo controla totalmente la infección y una vez cumplido su cometido se reabsorbe dejando tan sólo una pequeña cicatriz fibrosa que para mayor seguridad acostumbra a calcificarse En estas circunstancias es posible que la primoinfección haya sido asintomática y que incluso no deje secuelas detectables en la radiografía de tórax lo que si queda es la memoria inmunológica que se pondrá de manifiesto con la prueba de la tuberculina y permitirá diferenciar los individuos infectados (tuberculina positivos) de los no infectados (tuberculina negativos) <sup>(26)</sup> Así pues según el balance inicial entre el sistema inmunitario del huésped y las micobacterias tuberculosas se distinguen tres situaciones diferentes exposición sin infección infección sin enfermedad o estado de latencia y enfermedad activa (Figura # 3)**

## **2 1 Exposición sin infección**

**Esta condición no desarrolla respuesta inmunitaria (reacción de la tuberculina negativa) no hay evidencia de enfermedad**

## **2 2 Infección latente**

En cualquier área donde el bacilo se localice provocará una reacción inflamatoria que constituye el chancro de inoculación habitualmente pulmonar y mucho menos frecuentemente digestivo cutáneo o mucoso Alrededor del bacilo se agrupan una serie de células mononucleadas linfocitos y macrófagos con algunas células gigantes (células de Langhans) El centro de este folículo o granuloma suele necrosarse y luego se calcifica En la mayoría de los casos se produce la destrucción de las micobacterias y la única evidencia de infección es un test cutáneo de hipersensibilidad a la tuberculina positivo y otras veces los bacilos pueden persistir en forma latente En una minoría de casos los antigenos en el complejo primario (foco pulmonar inicial más el ganglio linfático regional) alcanzarán una concentración suficiente de hipersensibilidad que resultaría en una necrosis y calcificación visible radiológicamente Junto con el desarrollo de hipersensibilidad pueden asociarse manifestaciones alérgicas como eritema nodoso o queratoconjuntivitis fíctenular La mayoría de estos casos quedan en esta primo-infección que da lugar a la alergia tuberculinica y a la inmunidad tuberculosa que provoca un estado defensivo en el organismo hacia nuevas infecciones o a la diseminación de la infección en curso Esta inmunidad fallará bajo alguna circunstancia que produzca immunodepresión provocando una enfermedad tuberculosa meses o años después de la

infección por el mismo bacilo reinfección endógena o por reinfección exógena (adquisición de un nuevo bacilo del exterior)

## 2 3 Enfermedad

Se manifiesta por un gran polimorfismo con variadas localizaciones ya sean pulmonares o extrapulmonares (menos frecuentes) La tuberculosis pulmonar puede ser aguda, neumónica o bronconeumónica Puede provocar una diseminación hematógena con afectación miliar o meningea, así como también complicación bronquial debido a adenopatías mediastinales que pueden ocasionar atelectasias por comprimir el árbol bronquial Las bacterias de la tuberculosis se activan si el sistema inmunitario no puede detener su crecimiento Cuando las bacterias de la tuberculosis están activas (multiplicándose en el cuerpo de la persona) se le denomina enfermedad de la tuberculosis Las personas enfermas de tuberculosis pueden también transmitir las bacterias a otras personas En muchas personas la infección de tuberculosis latente nunca se convertirá en la enfermedad Algunas personas se enferman de tuberculosis poco después de contraer la infección (en las semanas siguientes) antes de que las defensas del sistema inmunitario puedan combatir a las bacterias Otras personas se enferman años después cuando su sistema inmunitario se debilita por otras causas Para las personas con sistemas inmunitarios debilitados especialmente las que tienen la

infección por el VIH, el riesgo de enfermarse de tuberculosis es mucho mayor que las personas con sistemas inmunitarios normales.

**Figura 3**  
**PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS**



Tomado de: <http://www.tuberculosis.pe/content/infografia-ataca-tuberculosis>

**Tabla 1**  
**DIFERENCIAS ENTRE LA INFECCIÓN DE TUBERCULOSIS LATENTE Y LA ENFERMEDAD DE TUBERCULOSIS<sup>(27)</sup>**

Una persona con la infección de tuberculosis latente	Una persona con la enfermedad de tuberculosis
Nº tiene ningún síntoma	Presenta síntomas que pueden incluir <ul style="list-style-type: none"> <li>○ tos intensa que dura 3 semanas o más</li> <li>○ dolor en el pecho</li> <li>○ tos con sangre o esputo</li> <li>○ debilidad o fatiga</li> <li>○ pérdida de peso</li> <li>○ falta de apetito</li> <li>○ escalofríos</li> <li>○ fiebre</li> <li>○ sudores nocturnos</li> </ul>
No se siente mal	Por lo general, se siente mal
Nº puede transmitir las bacterias de la tuberculosis a otras personas	Puede transmitir las bacterias de la tuberculosis a otras personas
Por lo general, el resultado de la prueba cutánea de la prueba de sangre indica que tiene una infección por tuberculosis	Por lo general, el resultado de la prueba cutánea de la prueba de sangre indica que tiene una infección por tuberculosis
Presenta una radiografía de tórax normal y un resultado negativo al frotis de esputo	Puede tener una radiografía de tórax anormal o un resultado positivo al frotis o el cultivo de esputo
Necesita tratarse la infección de tuberculosis latente para evitar que se convierta en enfermedad de tuberculosis	Necesita tratarse la enfermedad de tuberculosis

### 2.3.1 Manifestaciones clínicas de la Enfermedad

La tuberculosis posprimaria, también conocida como secundaria o tuberculosis de tipo adulto es la forma clínico radiográfica más frecuente aunque en general el individuo no tiene constancia de la primoinfección previa por las características de ser asintomática o poco aparente

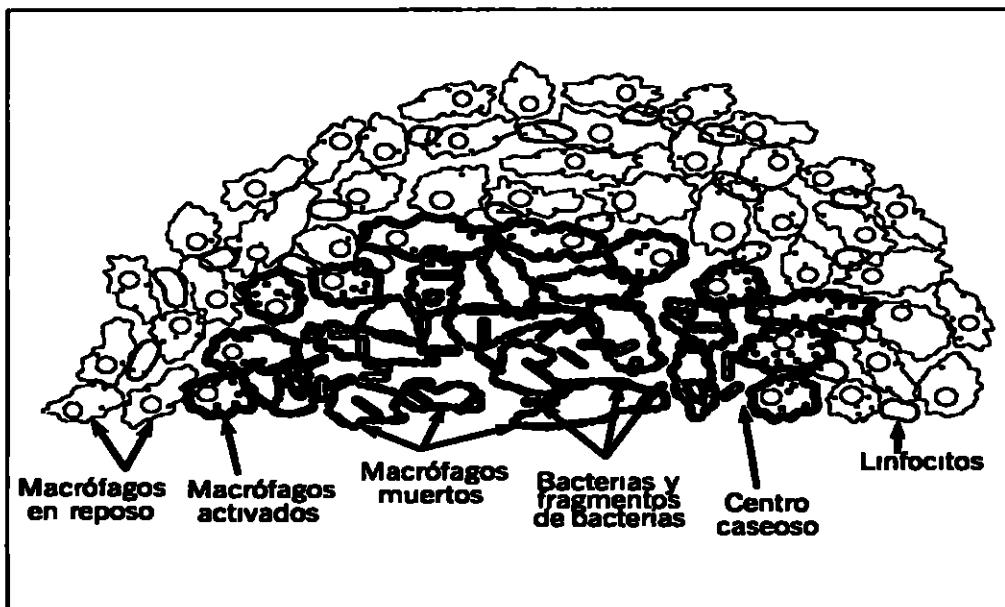
En algunos casos sobre todo en los países con alta prevalencia de tuberculosis la tuberculosis posprimaria se debe a una reinfección exógena pese al relativo grado de inmunidad del sujeto infectado. No obstante lo más común es la reinfección endógena por micobacterias latentes capaces de resistir en el interior de algunas células o en pequeños focos caseosos en condiciones metabólicas adversas en un continuo equilibrio con las defensas orgánicas que se rompe tras muchos años por alteraciones transitorias o persistentes de la inmunidad.

De cualquier forma, la respuesta será distinta en el individuo reinfecado que en el previamente sano como ya puso de manifiesto Koch con un clásico experimento si se inocula a un cobayo sano bacilos de MTB por vía subcutánea, se forma en el punto de inoculación un absceso que posteriormente se ulcera, se infartan los ganglios linfáticos regionales y al cabo de pocas semanas el animal muere por diseminación generalizada de la tuberculosis. Si esta misma experiencia se realiza en un animal con previa exposición a tuberculosis en lugar de una ulceración se forma una escara que cicatriza, no aparecen adenopatías y el animal no muere es decir que si sobrevive a la primera infección es capaz de presentar un cierto grado de resistencia frente a posteriores agresiones lo que le permite al menos localizar la enfermedad e impedir su diseminación. Esto explica, en gran parte las diferentes características de la primoinfección y de la tuberculosis posprimaria en el hombre.<sup>(26)</sup>

### **3 TRATAMIENTO**

Antes que existieran drogas efectivas la mitad de los pacientes con tuberculosis pulmonar morían en 2 años y sólo 25% se curaban. Con el advenimiento de la quimioterapia los tratamientos con largos períodos de reposo en cama, aislamiento prolongado y colapsoterapia, se tornaron innecesarios. El tratamiento de la tuberculosis se basa en conceptos muy distintos a los de las demás infecciones bacterianas. MTB tiene un tiempo de generación prolongado y la capacidad para entrar en períodos de latencia con una actividad metabólica limitada, lo cual dificulta la acción de los antimicrobianos.<sup>(28)</sup> Respecto al tratamiento existen poblaciones de bacilos diferentes en función de su localización y actividad (Figura 4). Así los bacilos presentes en las cavidades pulmonares se multiplican de forma activa en un ambiente aerobio; los del interior de los macrófagos lo hacen en un ambiente microaerofílico que induce la latencia, y los que se encuentran en el interior del *caseum* tienen sólo ocasionalmente un ciclo replicativo (crecimiento intermitente). Por otra parte MTB puede multiplicarse en los tejidos, donde la penetración de los antibióticos es fácil o bien encontrarse en cavidades pulmonares pus o material caseoso en donde la penetración de los antibióticos resulta más difícil. Finalmente hay que señalar que el pH del material caseoso y el del interior de los macrófagos es muy bajo lo cual condiciona la actividad de los distintos fármacos.<sup>(29)</sup>

**Figura 4**



*Figura 4 Representación esquemática de la estructura de un foco caseoso  
Tomado de Bentrup y Russell*

Los fármacos antituberculosos presentan un perfil de actividad diferenciado frente a cada una de estas localizaciones y poblaciones (Figura 4) y es necesario asegurarse de que el tratamiento prescrito sea activo frente a todas ellas

Las micobacterias presentan una resistencia natural a numerosos antibacterianos. Considerando además que aunado a la resistencia natural se ha identificado la resistencia primaria y la resistencia secundaria, como se describe a continuación

- **Resistencia natural** Aparece sin que la cepa bacteriana haya estado expuesta al fármaco. Es causada por mutaciones que ocurren al azar en poblaciones bacterianas numerosas. Para evitarla se utilizan varios

**farmacos por lo improbable de la aparición de resistencia natural a más de un fármaco**

- **Resistencia Primaria** Es cuando la infección se produce por el contagio con un bacilo que ya era resistente al antimicrobiano. Es causada por la diseminación de bacilos resistentes. Para evitarla se crean medidas higiénicas que eviten la diseminación de bacilos resistentes a partir de enfermos sin tratar o en el transcurso del tratamiento.
- **Resistencia Secundaria** Se desarrolla en bacilos que son sensibles al inicio y se vuelven resistentes durante el tratamiento. Es causada por monoterapias, tratamientos inadecuados, tratamientos incompletos. Para evitarla se emplean varios fármacos. La multiterapia reduce la posibilidad de que aparezcan mutantes.

Como *Mycobacterium tuberculosis* posee una pared compleja, muy hidrófoba, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos el tratamiento de la tuberculosis se realiza con antimicrobianos específicos (con actividad antituberculosa) (30)

### **Fármacos de Primera Línea**

La tuberculosis tiene un tratamiento eficaz que asegura, en los casos no complicados una tasa de curación superior al 95%. El éxito de este

tratamiento se basa en la asociación de fármacos y en su larga duración isoniacida (hidracina del ácido isonicotínico INH) rifampicina (RIF) y piracínamida (amida del ácido pirocinoico PZA) los primeros <sup>(31)</sup> meses e INH y RIF hasta completar los 6 meses de tratamiento <sup>(32, 33)</sup>. Debe añadirse un cuarto fármaco en aquellas zonas con una incidencia de resistencia primaria a la INH superior al 4% cuando el paciente ha sido previamente tratado con antumicobacterianos cuando el paciente es de un país con una elevada incidencia de tuberculosis resistente o cuando existe el antecedente de contacto con un paciente con tuberculosis resistente conocida. Este cuarto fármaco sería etambutol (ETB) para los adultos y estreptomicina (STR) para los niños en quienes no es posible monitorizar la agudeza visual. Los fármacos mencionados se conocen como fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis <sup>(34)</sup>.

#### *Isoniacida (INH)*

La INH es activa tan sólo frente a los bacilos en replicación activa, siendo su papel muy limitado en las poblaciones que replican lentamente como las del caseum o en las poblaciones latentes como las del interior de los macrófagos <sup>(34)</sup>.

#### *Rifampicina (RIF)*

RIF tiene un efecto bactericida sobre las células de *M. tuberculosis* metabólicamente activas y también posee una excelente acción esterilizante de las bacterias en estado de latencia (que sólo presentan ocasionalmente

actividad metabólica) tanto en los focos necróticos como en el interior de los macrófagos (34)

*Piracínamida (PZA)*

Es un derivado sintético de la nicotinamida. Posee un potente efecto esterilizante sobre los bacilos tuberculosos latentes en el interior de los macrófagos que permite cuando se usa asociada a la RIF acortar a 6 meses el tratamiento de la tuberculosis sensible. Pero carece de actividad frente a las demás micobacterias incluyendo otros componentes del complejo tuberculosis (34)

*Etambutol (EMB)*

Etilen-diamino-dibutanol es un producto isomérico dextrógiro derivado de la etilendiamina. Es activo frente a células en crecimiento activo. Tiene una actividad variable sobre las demás especies de micobacterias de crecimiento lento y su actividad es mucho menor en las especies de crecimiento rápido. Inhibe de forma específica la biosíntesis de la pared micobacteriana (34)

*Estreptomicina (STR)*

La STR es un antibiótico aminoglucósido que interfiere en la síntesis proteica bloqueando la traducción del ARNm tanto en su inicio como en la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica. Activo frente a bacilos extracelulares (34)

## **Fármacos de Segunda Línea**

Existen también otros fármacos de segunda línea o de reciente desarrollo que constituyen como veremos alternativas para el tratamiento en determinadas situaciones en donde el paciente presenta resistencia a los fármacos de primera línea, principalmente a INH y RIF que son las dos drogas más importantes para en el tratamiento antifímico Un paciente resistente a INH y RIF es considerado multi droga resistente (MDR) y requiere de un esquema de tratamiento con fármacos de segunda línea, más costosos con más efectos secundarios y con una duración más extendida del tratamiento <sup>(34)</sup> Algunos de estos fármacos son

### ***Etionamida (ETH)***

La etionamida (Etil tio-isonicotinamida) y la protionamida (propil tio isonicotinamida) son derivados del ácido isonicotínico con una potente actividad frente a *M tuberculosis* y otras micobacterias La ETH inhibe la síntesis de ácidos micolíticos y estimula las reacciones de oxidorreducción Su mecanismo de acción es parecido al de la INH Por consiguiente las mutaciones en el gen *inhA* que confieren una resistencia de bajo nivel a la INH también producen resistencia a la ETH <sup>(35)</sup>

### ***Amicacina kanamicina capreomicina y viomicina***

La amicacina y la kanamicina, junto con la estreptomicina, son aminoglucósidos similares estructuralmente y poseen actividad antituberculosa La capreomicina y la viomicina son antimicrobianos

peptídicos básicos que comparten el mecanismo de acción con los aminoglucósidos. No se absorben por vía oral siendo de administración intramuscular.

#### *Cicloserina*

La D cicloserina (4 amino-3 isoxazolidinona) es un análogo de la D alanina que inhibe de forma competitiva, las enzimas D alanil D alanina sintetasa, alanina racemasa y alanina permeasa, interfiriendo con la síntesis de la pared micobacteriana.<sup>(36)</sup> Es activa frente a todas las micobacterias así como frente a otros microorganismos.

#### *Fluoroquinolonas*

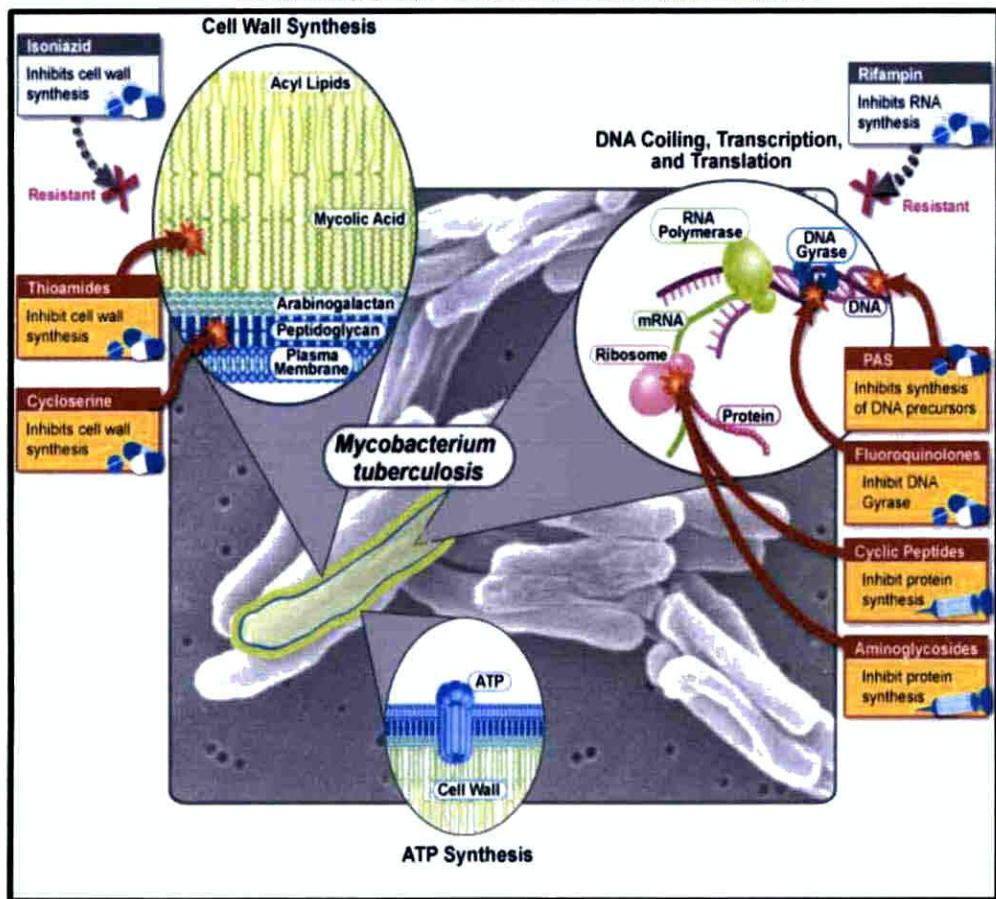
La actividad de las quinolonas tiene lugar a nivel de las topoisomerasas de tipo II y fundamentalmente sobre la ADN gúrra compuesta de dos subunidades A y dos subunidades B codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente.

#### *Ácido paraaminosalicílico (PAS)*

PAS es activo frente a *M. tuberculosis* mientras que las demás micobacterias son resistentes. Es activo frente a la población de crecimiento extracelular. El mecanismo de acción del PAS no se conoce con exactitud. Se la ha atribuido inhibición de la síntesis de ácido fólico del metabolismo del ácido salicílico y del transporte de hierro.

**La paradoja del tratamiento de la tuberculosis es que cuando se cumplen 50 años de la introducción de una quimioterapia eficaz, el numero de casos de la enfermedad a escala mundial es mayor y lo que es más alarmante aumenta el numero de infecciones por cepas resistentes a los fármacos antituberculosos** Un tercio de la población mundial está infectada aproximadamente existen 9 millones de nuevos casos de la enfermedad por año y 2 5 millones de muertes <sup>(37 38)</sup> A esta situación han contribuido la pandemia por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) <sup>(39)</sup> la reducción de la financiación de los programas de control de la enfermedad, los movimientos migratorios a partir de países con gran incidencia de tuberculosis y el incremento de la incidencia de cepas multiresistentes <sup>(40 41)</sup>

**Figura 5**  
**FARMACOS CONTRA *M. tuberculosis***



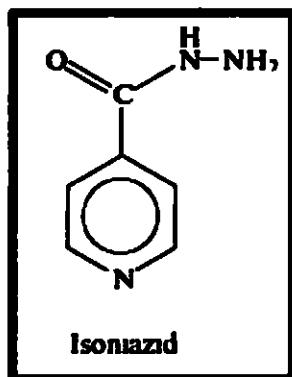
Tomado de Curiosidades de la Microbiología (<http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com/2012/03/como-buscar-nuevos-objetivos-para-un.html>)

### **3 1 Mecanismo de acción y mecanismo de resistencia de los dos principales fármacos del tratamiento antifílmico Isoniacida y Rifampicina**

#### **3 1 1 Isoniacida**

##### **3 1 1 1 Mecanismo de acción de la Isoniacida**

Desde que se conoció la actividad clínica de la isoniacida (forma hidracida del ácido isonicotínico INH) por Robitzek y Selikoff en 1952 <sup>(42)</sup> ha sido la droga más comúnmente utilizada contra *Mycobacterium tuberculosis*. La INH está conformada por un anillo de piridina y un grupo hidrazida (Figura 6). Y es un análogo de nicotinamida estructuralmente relacionado a otras drogas antifílmicas como la etionamida y pirazinamida <sup>(43)</sup>



**Figura 6**

**Estructura química de la Isoniacida**

Por su potencia y actividad bactericida forma parte del esquema de drogas de primera línea contra *M. tuberculosis*. Sin embargo la resistencia a INH

ha sido reportada con una incrementada frecuencia, con las tasas más elevadas en el sudeste de Asia y la Federación Rusa (44 45)

INH parece penetrar con facilidad las células del hospedero (46 47) y difundirse a través de la membrana de *M. tuberculosis* (48 49). La INH es una pro-droga y requiere de una activación oxidativa por la enzima catalasa peroxidasa codificada por el gen *katG* en *M. tuberculosis*. Aunque se ha reportado que los metabolitos activos de INH inhiben múltiples vías celulares esenciales incluyendo la síntesis de ácidos nucleicos (50) y fosfolípidos (51) parece que la principal ruta inhibida es la síntesis de ácidos micólicos (52, 53).

Los ácidos micólicos son ácidos grasos ramificados de cadena muy larga (hasta 90 átomos de carbono) constituyen uno de los componentes principales de la envoltura de la célula micobacteriana y contribuyen en gran medida a su impermeabilidad. De los casi 4000 genes que conforman el genoma de *M. tuberculosis* llama la atención la elevada proporción de su capacidad codificante destinada a la expresión de enzimas implicadas en lipogénesis y lipólisis. Pocas bacterias son capaces de sintetizar una gama de moléculas lipofílicas tan variada como *M. tuberculosis*.

Uno de los genes presente dentro del cromosoma de este patógeno (así como también de otras especies de micobacterias) codifica para una enzima que contiene todos los dominios funcionales requeridos para la síntesis de ácidos grasos denominada sintetasa de ácidos grasos de tipo I o FASI (Fatty Acid

**Synthase I)** Lo llamativo de la presencia de esta enzima en micobacterias es que es la misma que sintetiza ácidos grasos en eucariotas desde la levadura *S cereviseae* hasta el ser humano (55 56 57 58 59)

### **3 1 1 2 Genes involucrados en los mecanismos de resistencia a isonicida**

#### ***Gen inhA***

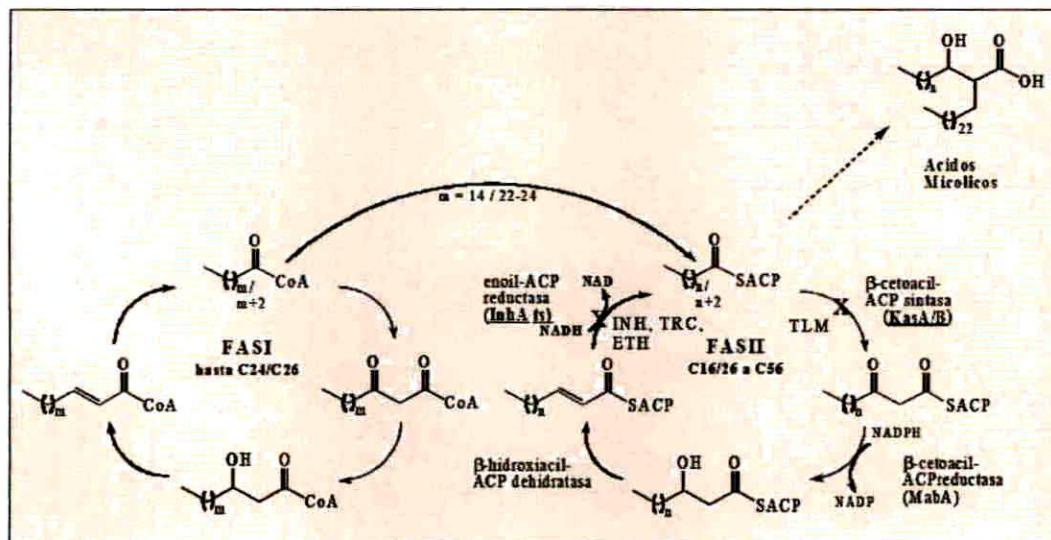
La identificación del blanco de acción de INH en micobacterias fue realizada, en su mayor parte por el grupo de W R Jacobs y contribuyó no solamente a aclarar el mecanismo de acción de la INH sino también a comprender la ruta biosintética de los ácidos micólicos. El grupo de Jacobs aisló cepas mutantes de la micobacteria no patógena de crecimiento rápido *M smegmatis* resistentes a INH, y clonó e identificó el gen responsable. Este gen también presente con alto grado de homología en *M tuberculosis* y *M bovis* BCG fue denominado *inhA* y se vio que mostraba gran similitud con el gen *fabI* de *E coli* involucrado en la síntesis de ácidos grasos de bacterias mediada por FASII (Figura 7). Esta información adquiere relevancia si se recuerda que INH causa inhibición de la síntesis de los ácidos micólicos en micobacterias pero no afecta la síntesis de los ácidos grasos de cadena más corta producidos por FASI. Al mismo tiempo podría estar señalando la existencia de dicho sistema en micobacterias dado que *fabI* es parte de FASII. Esta posibilidad estaría sustentada por la necesidad de contar con un sistema de síntesis para los ácidos micólicos con lo cual las micobacterias

tendrían sistemas específicos para la síntesis de ácidos grasos "normales" (necesarios para la síntesis de membrana citoplasmática) y "extra-largos".

La secuenciación del gen mutado en cepas de *M. smegmatis* INH<sup>R</sup> mostró que el cambio del aminoácido Serina 94 por Alanina (Ser94Ala) era el responsable de la resistencia a INH. Asimismo se demostró que esta cepa mutante presentaba resistencia cruzada a la droga antifímica de segunda línea etionamida<sup>(60)</sup>, la que también actúa inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos<sup>(61)</sup>. Sin embargo, numerosos aislamientos clínicos resistentes a isoniacida (INH<sup>R</sup>) eran etionamida sensible (ETH<sup>S</sup>), lo que sugiere blancos distintos.

**Figura 7**

**Esquema de la ruta biosintética de los ácidos grasos y ácidos micólicos en micobacterias**



Estudios llevados a cabo por Ortiz de Montellano y otros investigadores mostraron recientemente que la etionamida es también una prodroga activada por una monooxigenasa denominada EthA<sup>(62,63 64)</sup> y esto justificaría la proporción de aislamientos clínicos INH<sup>R</sup> ETH<sup>S</sup>. El hecho de que cepas clínicas mostraran resistencia tanto a INH como a ETH indicaba un mecanismo de resistencia compartido lo que fue confirmado al clonar y secuenciar el gen *inhA* en cepas INH<sup>R</sup> *katG* (+) y ETH<sup>R</sup> *ethA* (+). En todas las cepas analizadas se encontraron mutaciones en *inhA* que eran suficientes para impedir la unión de INH activado y ETH activado<sup>(65 66 67 68 69)</sup>. La identificación de *inhA* como blanco de acción de INH en micobacterias llevó a la secuenciación del gen *inhA* en numerosos aislamientos clínicos y se encontró que las mutaciones más frecuentes eran de dos tipos 1) en la región promotora de *inhA* (este gen está ubicado corriente abajo del gen *mabA* con el cual forma un operón y 2) en la región codificante de *inhA*.

#### ***Gen katG***

La resistencia a INH entre aislados clínicos de *M. tuberculosis* ha estado asociada con pérdida de actividad de la enzima catalasa peroxidasa<sup>(70)</sup>. En general hay una relación inversa entre el grado de resistencia a INH y la actividad de la catalasa<sup>(71)</sup>. Zhang y colegas demostraron que la deficiencia en *katG* el cual codifica la enzima catalasa peroxidasa de *M. tuberculosis* está relacionada con la resistencia a INH en aislados clínicos de *M.*

*tuberculosis* (72,73) Mutaciones en *katG* reducen la capacidad de la enzima de activar la pro-doga INH lo que conduce a la resistencia El gen *katG* en *M tuberculosis* esta situado en una región altamente variable e inestable del genoma, quizás debido a la presencia de secuencias repetitivas de ADN (54) predisponiendo potencialmente de este modo a una alta frecuencia de mutaciones en *katG* Mutaciones puntuales en *katG* son más comunes que las delecciones en aislados clínicos resistentes a INH La mutación puntual que resulta en una substitución de treonina por serina en el codón 315 (S315T) se presenta en la mayoría de los aislados clínicos resistentes a INH (74,75) La mutación S315T está asociada con una reducción del 50% en la actividad catalasa peroxidasa y con un alto nivel de resistencia (MIC=5 10µg/ml) (76,77) Se espera que estudios de cristalografía de la catalasa peroxidasa de *M tuberculosis* (78) permita una interpretación más exacta de la estructura y los efectos funcionales causados por las mutaciones en aislados clínicos resistentes a INH

### ***Otros genes***

El rol de las mutaciones en *kasA* el cual codifica a β ketoacyl ACP sintasa del sistema sintasa de ácidos grasos tipo II es controversial Reportes iniciales identificaron una asociación entre resistencia clínica de INH y cuatro mutaciones independientes en *kasA* (79) pero estudios posteriores reportaron la presencia de 3 de estas mutaciones en cepas sensibles a INH de

*M tuberculosis*<sup>(80 81)</sup> A pesar de que se ha reportado un incremento de hasta cinco veces en la concentración inhibitoria mínima (CIM) de INH luego de la sobreexpresión de *kasA* en *M tuberculosis*<sup>(82)</sup> también se ha reportado que la sobreexpresión de *kasA* confirió resistencia a tiolactomicina, un conocido inhibidor de *kasA* pero no incrementó la resistencia a INH en *M smegmatis* *M bovis* BCG y en *M tuberculosis*<sup>(83)</sup> Utilizando INH radioactiva, Mdluli y colaboradores reportaron que *kasA* está covalentemente asociada con INH y ACP en *M tuberculosis*<sup>(79)</sup> pero Kremer y colaboradores usaron anticuerpos anti *kasA* para demostrar que el tratamiento con INH en micobacteria no resulta en un secuestro significante de *KasA* y también demostraron en un ensayo *in vitro* que la INH activada no inhibe la actividad de *kasA*<sup>(84)</sup> Aunque la prevalencia de evidencia sugiere que *inhA* y no *kasA* es el primer blanco de INH en la ruta de síntesis de los ácidos micólicos el rol de las mutaciones de *kasA* en la resistencia a INH de aislados clínicos requiere más investigación

Mutaciones en *ndh* (que codifica NADH deshidrogenasa) demostraron conferir resistencia a INH y etionamida en *M smegmatis* Tales mutaciones reducen la actividad de NADH deshidrogenasa generando multiples fenotipos resistencia cruzada a INH y ETH letalidad termo sensible y auxotrofia<sup>(85)</sup> Dichas mutaciones se han detectado en el 10% de aislados

clínicos resistentes a INH los cuales no contenían mutaciones en *katG*, *inhA* o *kasA*<sup>(80)</sup>

Se ha observado que mutaciones en la región promotora de *ahpC* conducen a una sobreexpresión de la alquil hidroperóxido reductasa en *M. tuberculosis* resistente a INH<sup>(86)</sup>. Estas mutaciones raramente se observan en cepas resistentes a INH sin mutación en *katG*<sup>(87)</sup>. Sin embargo están presentes en cepas resistentes a INH por mutación en *KatG* presumiendo que esto se deba a un mecanismo compensatorio por la pérdida de actividad de la catalasa peroxidasa en tales cepas<sup>(88-89)</sup>. Parece que *ahpC* no juega un rol directo en resistencia a INH, porque la sobreexpresión de *ahpC* en cepa tipo salvaje de referencia de *M. tuberculosis* no muestra apreciable incremento de la CIM para INH, por lo que mutaciones en la región promotora de *ahpC* pueden servir como un útil marcador para detección de resistencia a INH.

A pesar de la identificación de varias mutaciones genéticas asociadas con resistencia a INH, casi un cuarto de todos los aislados clínicos resistentes a INH no presentan mutaciones en ninguno de los genes antes descritos sugiriendo otros mecanismos alternativos de resistencia a INH.

### 3.1.2 Rifamicinas

Las rifamicinas fueron primero aisladas en 1957 de *Amycolatopsis* (anteriormente *Streptomyces*) *mediterranei* como parte de un programa de detección de antibióticos en Italia<sup>(90)</sup>. Su descubrimiento y uso extendido

ha revolucionado la terapia antituberculosa permitiendo la reducción de la duración del tratamiento de 18 meses a 9 meses<sup>(91)</sup> Aunque la actividad bactericida temprana de las rifamicinas es inferior a la de la INH<sup>(92,93)</sup> las rifamicinas son los agentes esterilizadores más potentes disponibles en el tratamiento contra TB mata los bacilos persistentes a lo largo de toda la duración de la terapia<sup>(94,95)</sup>

Las rifamicinas se caracterizan por una única estructura química que consiste de un núcleo aromático unido en ambos lados por un puente alifático<sup>(99)</sup> Aunque los cambios estructurales en posiciones C 21 C 23 C 8 o C 1 pueden reducir significativamente la actividad microbiológica, modificaciones en C 3 no alteran la actividad microbiológica

Las rifamicinas están altamente unidas a proteínas en el plasma, pero difunden fácilmente por la membrana celular de *M. tuberculosis* debido a su naturaleza lipofílica<sup>(100)</sup> La actividad bactericida de las rifamicinas ha sido atribuida a su capacidad para inhibir la síntesis de ARNm por la unión con una alta afinidad a la polimerasa ARN bacteriana dependiente de ADN<sup>(101)</sup>

La Rifampicina es un antibiótico de amplio espectro y es la rifamicina más ampliamente usada para tratar tuberculosis La Rifabutina es otra rifamicina con reducida inducción del sistema enzimático hepático citocromo P-450 originalmente demostró ser efectiva para la profilaxis<sup>(96)</sup>

**y tratamiento<sup>(97)</sup> de la infección por el complejo *M avium intracellulare* en personas con una avanzada enfermedad del VIH**

Otra rifamicina con propiedades farmacocinéticas favorables es la Rifapentina la cual presenta una mayor concentración en suero y una vida media prolongada, lo cual permite una terapia altamente intermitente para pacientes VIH negativos quienes no tienen cavitación en la placa torácica y quienes tienen cultivo de esputo negativo después de los dos meses de terapia (98)

### **3 1 2 1 Mecanismo de acción de Rifampicina**

La estructura central de la ARN polimerasa comprende las subunidades  $\alpha_2\beta\beta'$  evolutivamente conservada entre procariotas lo cual explica la actividad antimicrobiana de las rifamicinas contra un amplio rango de bacterias La cristalografía de rayos X examinando la interacción de Rifampicina y ARN polimerasa de *Thermus aquaticus* reveló que la rifampicina ejerce su efecto al unirse a las dos subunidades  $\beta$  de la ARN polimerasa bloqueando directamente la ruta de elongación del ARN transcripto<sup>(102)</sup>

Aunque el blanco molecular de la rifampicina ha sido bien caracterizado el mecanismo preciso por el cual esta interacción conduce a la muerte de micobacterias aun no está claro

### **3 1 2 2 Gen involucrado en el mecanismo de resistencia a Rifampicina**

#### ***Gen rpoB***

Aunque la resistencia sólo a INH es común en *M. tuberculosis* la resistencia solo a RIF no es común y más porque el 90% de los aislados resistentes a RIF son también resistentes a INH Por lo tanto resistencia a RIF ha sido usada como un marcador indirecto para detectar tuberculosis multidroga resistente<sup>(103)</sup>

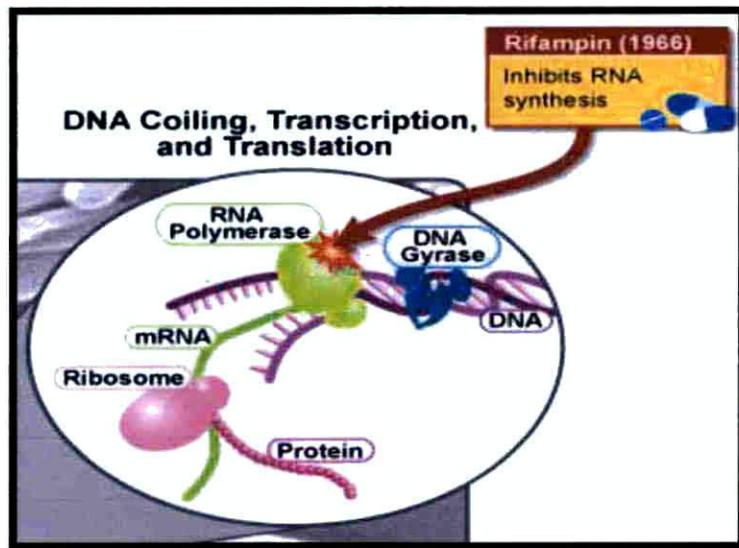
Como en *E. coli* <sup>(104 105)</sup> la resistencia a RIF en *M. tuberculosis* surge de mutaciones en *rpoB* el cual codifica la subunidad β de la ARN polimerasa <sup>(106)</sup> La mayoría de los aislados clínicos resistentes a RIF contienen mutaciones puntuales agrupadas en una región de 81 pares de bases entre los codones 507 y 533 del gen *rpoB* <sup>(107 108)</sup> Aunque al menos de 35 variantes alélicas han sido descritas <sup>(107)</sup> las sustituciones de aminoácidos en una de las dos posiciones (Ser<sub>531</sub> o His<sub>526</sub>) representan la mayoría de las mutaciones que confieren resistencia clínica a RIF <sup>(106 108 109)</sup> Consistente con los datos clínicos la selección espontánea de resistencia a rifampicina *in vitro* en la cepa de laboratorio de referencia *M. tuberculosis* H37Rv muestra mutaciones en *rpoB* solamente en Ser<sub>531</sub> o His<sub>526</sub>, predominando la mutación Ser<sub>531</sub> Leu <sup>(110)</sup> Las cepas con las mutaciones puntuales CAC → TAC (His → Tyr) en el codón 526 y TCG → TTG (Ser → Leu) en el codón 531 responsable del

30% y 25% respectivamente de la resistencia a RIF en aislados clínicos en los Estados Unidos<sup>(111)</sup> En otros países estas mismas mutaciones representan 12% y 47% de los casos resistentes a RIF lo cual sugiere una variación en la frecuencia de aparición de mutaciones en *rpoB* en regiones geográficas diferentes<sup>(107)</sup> A diferencia de las mutaciones en los codones 531 y 526 los cuales confieren un alto nivel de resistencia a RIF (MIC>32µg/ml) y resistencia cruzada para todas las rifamicinas<sup>(100)</sup> mutaciones en los codones 511 516 y 522 están asociados con bajo o alto nivel de resistencia a rifampicina y rifapentina (MIC 2-32µg/ml) pero con sensibilidad a rifabutina y a la nueva rifamicina, rifalazil<sup>(112,113)</sup> Mutaciones raras en *M tuberculosis* han sido también reportadas en la región 5 del gen *rpoB* y una de estas mutaciones en V176F confiere una resistencia de intermedia a alta a RIF<sup>(114,115)</sup>

Varias cepas de micobacterias de rápido crecimiento *M smegmatis* *M chelonae* *M slavescens* y *M vaccae* son capaces de inactivar RIF por ribosilación conduciendo a una resistencia inherente a este antibiótico<sup>(116,117)</sup> Sin embargo este mecanismo de resistencia a RIF no ha sido descrito en *M tuberculosis* No obstante un pequeño porcentaje de aislados resistentes a RIF (<5%) no presentan ninguna mutación en el gen *rpoB* sugiriendo un mecanismo molecular de resistencia a RIF en *M tuberculosis*

como por ejemplo una permeabilidad alterada a RIF o mutaciones en otras subunidades de la ARN polimerasa.

**Figura 8**  
**Mecanismo de acción de la Rifampicina**



## **METODOLOGÍA**

**1 Tipo de estudio Descriptivo – retrospectivo**

**2 Universo** El universo estaba conformado por todas las muestras de esputo con cultivo positivo para *Micobacterium tuberculosis* que se recibieron en el Departamento de Micobacteriología del Laboratorio Central de Referencia de Salud Pública – Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud, durante los años 2001 al 2011

**3 Muestras** Las muestras seleccionadas fueron todas las muestras con cultivo positivo para *Micobacterium tuberculosis* que luego de realizar el método de las proporciones múltiples de Canetti resultaron resistentes a INH y RIF. Fueron en total 66 aislados TB MDR panameños recolectados desde el 2001 hasta el año 2010. Y 31 muestras sensibles como control negativo recolectados entre 2009 y 2010

**4 Criterio de inclusión**

**Grupo experimental Aislados TB MDR recolectados entre 2001 y 2010**

**Grupo control Aislados de TB sensibles recolectados entre 2009 y 2010**

**5 Criterios de exclusión**

**Grupo experimental Aislados de TB sensibles**

**Grupo control Aislado de TB MDR**

## **6 Métodos**

Se realizaron los siguientes procedimientos

- 1 Identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* a nivel molecular con el kit comercial AccuProbe Gen Probe**
- 2 Extracción del ADN genómico**
- 3 Amplificación de los genes *katG* *inhA* *inhA* *mabA* y *rpoB* involucrados en la resistencia a Isoniacida y Rifampicina, respectivamente**
- 4 Secuenciación de los genes involucrados en la resistencia a Rifampicina e Isoniacida de las cepas en estudio e identificación de las mutaciones**
- 5 PCR Multiple alelo específico**

### **6.1 IDENTIFICACIÓN A NIVEL MOLECULAR DE LAS CEPAS EN ESTUDIO UTILIZANDO EL KIT COMERCIAL ACCUPROBE – GEN PROBE**

El primer objetivo específico de este proyecto fue realizar nuevamente la identificación pero a nivel molecular empleando el Kit comercial AccuProbe de Gen Probe para identificación a partir de cultivo del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

**Principio** Los ensayos que utilizan hibridación de ácidos nucleicos se basan en la capacidad de las cadenas complementarias de los ácidos nucleicos para

unirse de modo específico formando complejos bícatenarios estables. El método ACCUPROBE utiliza una sonda de DNA monocatenario conjugado con un marcador quimioluminiscente complementario del RNA ribosómico (RNAr) del organismo diana. Cuando el RNAr del organismo diana es liberado la sonda se hibrida con este para formar un complejo DNA-RNA estable. El reactivo de selección permite diferenciar las sondas hibridadas de las no hibridadas. El luminómetro GEN PROBE permite medir la señal lumínosa emitida por los híbridos DNA-RNA. El resultado es positivo si el luminómetro indica un valor superior o igual al valor umbral; es negativo si indica un valor inferior.

### **Procedimiento**

#### **A Identificación a partir de cultivo en medio sólido**

- 1 La muestra se obtuvo con un asa metálica a partir del medio de cultivo
- 2 En la medida de lo posible se evitó que la muestra incluyera medio de cultivo junto con las micobacterias

#### **B Preparación del material**

- 1 Se llenó el sonicador con agua suficiente hasta aproximadamente 1 cm del borde

- 2 El agua del baño de ultrasonidos fue cuidadosamente desgasificada antes de la manipulación con el fin de optimizar la transferencia de energía de los ultrasonidos Para desgasificar a fondo el agua, se puso a funcionar el sonicador durante 15 minutos antes de ser utilizado en cada lote de pruebas**
- 3 Se empleó un bloque a  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  y un baño maría a  $59 - 61^{\circ}\text{C}$**
- 4 Se utilizó el luminómetro 501 de GEN PROBE Verificando que la cantidad de Reactivos de Detección I y II era suficiente para realizar las pruebas**

#### **C Controles**

Como control positivo se utilizó la cepa American Type Culture Collection (ATCC 25177) de *M. tuberculosis* y un cultivo de *M. avium* del College American Pathology (CAP) como control negativo

#### **D Preparación de la muestra**

- 1 Se identificaron los tubos de lisis con los correspondientes números de ID de cada cepa Se trabajaron en grupos de 11 a 13 incluyendo en cada grupo el control negativo y positivo**
- 2 Se transfirió con micropipeta 100 $\mu\text{l}$  de Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) y 100 $\mu\text{l}$  de Reactivo 2 (Tampon de Hibridación) en todos los tubos de lisis**

- 3 Se transfirió la muestra proveniente del medio sólido al tubo de lisis agitando el asa en la solución para poner las células en suspensión**
- 4 Una vez tapados los tubos de lisis se agitaron brevemente con ayuda de un vortex**

#### **E Lisis de la muestra**

- 1 Los tubos de lisis se introdujeron en el portatubos del sonicador de manera que la muestra, en el fondo de los tubos quedó sumergida manteniendo los tapones fuera del agua**
- 2 Se procedió con la sonicación durante 15 minutos**
- 3 Luego se colocaron los tubos de lisis en el bloque calefactor a  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos**

#### **F Hibridación**

- 1 Una vez retirados los tubos de lisis del bloque calefactor se rotularon igual cantidad de tubos de Reactivo Sonda con los correspondientes números de identificación**
- 2 Despues se tomó  $100\mu\text{l}$  de muestra de los tubos de lisis y se transfirió a su correspondiente tubo de Reactivo Sonda**

**4 Tapados los tubos de Reactivo Sonda fueron incubados durante 15 minutos a 59 5° 61°C en baño maría**

### **G Selección**

**1 Retirados los tubos de Reactivo Sonda del baño maría se añadió 300µl de Reactivo 3 (Reactivo de Selección) en cada tubo Tapados los tubos fueron agitados con un Vortex para obtener una mezcla homogénea**

**2 Se incubaron los tubos de Reactivo Sonda durante 10 minutos a 59 5° 61°C al baño maría**

**3 Retirados los tubos de Reactivo Sonda del baño maría se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos Se leyeron los resultados dentro de los 15 minutos siguientes**

### **H Detección**

**1 Se seleccionó el protocolo # 4 para ACCUPROBE en el Luminómetro**

**2 Se limpió la superficie de los tubos con papel absorbente**

**3 Los tubos se colocaron los tubos en el Luminómetro y se procedió a obtener la lectura de cada muestra**

## **I Interpretación de los resultados**

Los resultados del test accuprobe para identificación a partir de cultivo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* son interpretados en función de un valor umbral. Las muestras que producen una señal luminosa de valor superior o igual a este umbral son consideradas positivas. Las señales luminosas inferiores a este umbral son consideradas negativas. Cuando el resultado se sitúa en una zona de incertidumbre la prueba debe repetirse. Si un segundo análisis sigue dando resultados dudosos debe sembrarse nuevamente la cepa con el fin de verificar su pureza.

### **ACCUROBE/Luminómetro 50i**

**Tabla 2**

<b>RLU</b>	<b>Interpretación</b>
<20000	<b>NEGATIVO</b>
20000 – 29999	<b>ZONA DE INCERTIDUMBRE</b>
> ó = 30000	<b>POSITIVO</b>

## **6.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO UTILIZANDO EL KIT COMERCIAL DE QIAGEN**

- 1 Se transfirieron 20μl de Proteinasa K en el fondo del tubo de microcentrifuga de 1.5ml
- 2 Se añadieron 200μl de muestra al tubo del paso anterior
- 3 Se añadieron 200μl de buffer AL a la muestra, vortex por 15s
- 4 Se incubó a 56°C por 10 minutos
- 5 Se procedió a centrifugar brevemente para remover las gotas que estaban en la tapa
- 6 Se añadieron 200μl de etanol (96-100%) a la muestra y vortex por 15s  
Después del vortex centrifugar brevemente el tubo de microcentrifuga para remover las gotas de la tapa
- 7 Se procedió a agregar cuidadosamente la mezcla del paso 6 a la columna QIAamp Mini spin que viene con su tubo de colección de 2ml Luego se procedió a centrifugar a 8000rpm por 1 min Luego se descartó el tubo de colección que contiene el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo de colección de 2ml
- 8 Cuidadosamente se destapó la columna y se añadió 500μl del buffer AW1 a la columna Se centrifugó por 8000rpm por 1 minuto y se procedió a descartar el filtrado

- 9 Se añadió a la columna 500μl de buffer AW2 Se centrifugó a máxima velocidad (14000rpm) por 3 minutos y se descartó el tubo de colección con el filtrado
- 10 Se colocó la columna QIAamp Mini spin en un nuevo tubo de colección y se centrifugó por 2 minutos a máxima velocidad (14000rpm)
- 11 Se colocó la columna QIAamp Mini spin en un tubo de 1.5 ml de microcentrifuga limpio y se añadió a la misma 200μl de buffer AE o agua destilada Se incubó a temperatura ambiente (15-25°C) por 2 minutos y luego se centrifugó (8000rpm) por 2 minutos
- 12 Se conservó el ADN extraído a -20°C

### **6.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *KATG*, *INHA*, *INHA-MABA* Y *RPO* INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A ISONIACIDA Y RIFAMPICINA, RESPECTIVAMENTE**

Se amplificaron regiones específicas de los genes *KatG* *inhA* *inhA mabA* y *rpoB* involucrados en la resistencia a INH y RIF respectivamente en las 66 cepas TB MDR y de las 31 cepas de *M. tuberculosis* sensibles a los antifúngicos (control negativo) Los cebadores y las condiciones para la amplificación y secuenciación de los genes involucrados en la resistencia de *M. tuberculosis* fueron adoptados de estudios previos <sup>(118 119)</sup> (Cuadro 4)

## Cuadro 4

Gen	Primer (5'-3')	Longitud del producto de PCR (pb)	Ciclo de amplificación
<b>KatG</b>			
KatGOF	<b>GCAGATGGGCTGATCTACG</b>	435	96°C 3 min, 25 X (95°C 50s, 68°C 40s, 72°C 1min), 72°C 10min
KatG4R	<b>AACGGGTCCCCGATGGTG</b>		
<b>InhA</b>			
inhAF	<b>GTATGGGCCACTGACACAACAC</b>	885	94°C 1 min, 26 X (94°C 30s, 68°C 30s, 72°C 1 min 30s), 72°C 7min
InhAR	<b>CCGCCGAACGACAGCAGCAGGA</b>		
<b>mabA-inhA:-15</b>			
inhAPF	<b>AATTGCGCGGTCAAGTTCCACAC</b>	648	94°C 1min, 26 X (94°C 30s, 68°C 30s, 72°C 1min 10s), 72°C 7min
inhAPR	<b>CTGCGCGATGCCGTTGAGC</b>		
<b>RpoB</b>			
ROF	<b>GTCGCCGCGATCAAGGA</b>	250	96°C 3min, 25 X (95°C 50s, 65°C 40s, 72°C 20s), 72°C 3min
RIR	<b>TGACCCGCGCGTACAC</b>		

**La mezcla de reacción se describe a continuación**

**Tabla 3**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentración</b>
MgCl <sub>2</sub>	1 0	50mM
DNTPs	1 5	10mM
Taq Pol	0 5	5U/ $\mu$ l
Buffer	2 5	10X
Primer F	0 5	10 $\mu$ M
Primer R	0 5	10 $\mu$ M
ADN	3 0	
H <sub>2</sub> O	15 5	

### **6 3 1 Electroforesis en gel de agarosa**

**Los productos de las amplificaciones fueron corridos en gel de agarosa al 0 5% en TBE 0 5X La electroforesis se realizó a 100V por una hora y los productos de la amplificación fueron visualizados en un transiluminador UV a 300nm**

**Los resultados de la corrida fueron registrados mediante una foto con el fotodocumentador para evaluar los productos obtenidos en relación a la escalera de peso molecular y al tamaño esperado**

### **6 3 2 Purificación de productos de PCR**

**Las muestras que amplificaron fueron purificadas por el método AgarAce™ de Promega El procedimiento se realizó igual como lo especifica el fabricante en el boletín técnico AgarAce®Agarose Digesting Enzyme No 228**

### **Cuantificación de productos purificados**

**Una vez purificados los productos fueron cuantificados La cuantificación se realizó utilizando un espectrofotómetro (biofotómetro) y diluyendo las muestra 1/50 para su medición**

## **6.4 SECUENCIACIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A RIFAMPICINA E ISONIACIDA DE LAS CEPAS EN ESTUDIO E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES**

En la reacción de secuenciación de cada gen se utilizaron los mismos cebadores de la amplificación. La secuenciación se realizó usando el reactivo de BigDye Terminator v 3.1 de Applied Biosystem. Los volúmenes de la muestra variaron en la mezcla de reacción de acuerdo a la concentración en cada muestra. El volumen final de la reacción fue de 20 μl (Tabla 4).

**TABLA 4**

	<b>Buffer 5X</b>	<b>Big Dye</b>	<b>Primer</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Muestra</b>	<b>Volumen Total</b>
KatGOF	3	2	1	12	20	20
KatG4R	3	2	1	12	20	20
inhAF	3	2	1	12.5	15	20
inhAR	3	2	1	12.5	15	20
inhAPF	3	2	1	12.5	15	20
inhAPR	3	2	1	12.5	15	20
ROF	3	2	1	12	20	20
RIR	3	2	1	12	20	20
PGEM	3	2	1	13	1	20

### **1 Edición de Secuencias**

Las muestras amplificadas y secuenciadas se editaron utilizando el software de análisis Sequencher para eliminar las áreas que no se podían leer claramente y para evaluar la base nucleotídica presente en la secuencia. Se

examinaron las secuencias para ver la presencia de cambios nucleotídicos en comparación a la cepa de referencia H37RV.

## 2. Análisis de los productos de secuenciación

Los datos de secuenciación fueron analizados y comparados con la cepa de referencia H37Rv (GenBank accession number NC\_000962.2) usando ClusterW multialignment.

## **6.5PCR MÚLTIPLE ALELO ESPECÍFICO**

Se realizó PCRMAS a todas las muestras en estudio, a partir del ADN extraído utilizando los siguientes cebadores adoptados de estudios previos (118,119) (Cuadro 5).

**Cuadro 5**

Mutaciones blancos	Primers alelo específico (5'-3')	Longitud del producto de PCR
KatG 315	KatG5R ATACGACCTCGATGCCGC	292
	KatGOF GCAGATGGGCTGATCTACG	
mabA-inhA-15	InhAP-15 GCGCGGTCAAGTCCACA	270
	InhAPF2 CACCCGACAACTATCG	
rpoB516	rpoB516 CAGCTGAGCCAATTCATGGA	218
	RIRm TTGACCCGCGCGTACAC	
rpoB526	rpoB526 CTGTCGGGGTTGACCCA	185
	RIRm TTGACCCGCGCGTACAC	
rpoB531	rpoB531 CACAAGCGCCGACTGTC	170
	RIRm TTGACCCGCGCGTACAC	

**La mezcla de reacción para PCRMAS:** El volumen final de la mezcla de reacción fue de 24.6 $\mu$ l con las siguientes concentraciones que se muestran a continuación:

**Tabla 5**

Reactivos	Concentración	Volumen ( $\mu$ L)
rpoB516	10 $\mu$ M	0,1
rpoB526	10 $\mu$ M	0,5
rpoB531	10 $\mu$ M	3,25
RIRm	10 $\mu$ M	3,0
KatgOF	10 $\mu$ M	0,1
Katg5R	10 $\mu$ M	0,1
inhAP-15	10 $\mu$ M	0,6
InhAPF	10 $\mu$ M	0,6
Taq	5U/ $\mu$ l	0,1
DNTPs	10Mm	0,5
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2,0
PCR Buffer	10X	2,5
DNA	-	1,0
H <sub>2</sub> O	-	10,25

## 1. Ciclo de amplificación

El ciclo de amplificación de PCRMAS fue: 96°C 3min, 23 ciclos de 95°C 50s, 68°C 40s, 72°C 1min y una extensión final a 72°C 7min.

## 2. Detección

Los productos de PCR-MAS fueron detectados en electroforesis en gel de agarosa al 2.5% con Buffer Tris -Borato-EDTA al 1X, durante una hora cuarenta y cinco minutos. Cada pocillo del gel fue cargado con 20 $\mu$ l (15 $\mu$ l de muestra más 5 $\mu$ l de loading buffer).

Interpretación de los resultados en el gel de agarosa: El extremo 3' terminal de cada cebador alelo específico anidará por complementariedad con la

segunda base del respectivo codón en estudio Por lo que si en el ADN blanco no hay mutaciones en estas bases o sitios blancos el cebador anidara y la polimerasa extenderá la cadena dándose un producto de amplificación Sin embargo cuando el ADN en estudio presente una mutación puntual de las descritas anteriormente el cebador alelo específico no podrá ser extendido por la ADN polimerasa por lo que no habrá producto de amplificación para esa región

#### **6.6 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR PCRMAS CON LOS OBTENIDOS A TRAVÉS DEL MÉTODO DE REFERENCIA.**

Con los resultados obtenidos de esta comparación se calculará la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica PCRMAS

## RESULTADOS

### ➤ IDENTIFICACIÓN A NIVEL MOLECULAR DE LOS AISLADOS EN ESTUDIO UTILIZANDO EL KIT COMERCIAL ACCUPROBE - GEN PROBE

El kit comercial AccuProbe Gen Probe confirmó la identificación bioquímica previa (prueba de niacina, reducción de nitrato e inhibición de la catalasa) realizada a cada uno de los 98 aislados en estudio. Valores de RLU superiores a 30000 corroboraron la presencia del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en cada una de las muestras analizadas.

#### Identificación molecular del complejo *M. tuberculosis* del grupo de aislados para control negativo

#### Aislados sensibles

PROTOCOL AP MYCOBAC			
THURSDAY	JULY 29 20 0	5 8 PM	
SOFTWARE REVISION		GP1	3 06
SYSTEM SERIAL NUMBER			203360
TYPE		DNA EQUAL	
COUNT TIME		2 SEC	
YIT LOT NUMBER			
OPERATOR	MYCODINTEROLGI	-LCREP	
REPORTING THRESHOLDS			
SAMPLE BELOW	20000	ND	NEGATIVE
RETNEE ABOVE/BAL	20000	29999	300000 POSITIVE
			--
SAMPLE	REPL	RLU	FLAG
2		>2060	POS
3		659	NEG
3		529370	POS
5	1	555922	POS
5	1	54 526	POS
6	1	523159	POS
8	1	395.6	POS
9		030 6	POS
9		95541	POS
10	1	517595	POS
1		95 55	POS
2		6 657	POS
13	1	185238	POS

# Sample	Cepas sensibles	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	7	POSITIVO
4	75	POSITIVO
5	85	POSITIVO
6	91	POSITIVO
7	92	POSITIVO
8	137	POSITIVO
9	157	POSITIVO
10	191	POSITIVO
11	211	POSITIVO
12	233	POSITIVO
13	235	POSITIVO

Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

Aislados sensibles

PROTOCOL AP MYCOBAC			
THURSDAY	JULY 29 2010	6 8 PM	
SOFTWARE REVISION		GPI	3 06
ITEM SERIAL NUMBER			203364
TYPE		DNA EQUAL	
COUNT TIME		2 SEC	
KI LOT NUMBER			
OPERATOR	YODONINTEROLLO	LCRSP	
-----			
REPORTING THRESHOLDS			
SAMPLE	20000		NEGATIVE
BELOW	20000	ND	29999
ABOVE/EQUAL			30000 POSITIVE
-----			
SAMPLE	REPL	RL	FLAG
1		1 216	POS
2		13e3	NEG
3	1	85057	POS
	1	500203	POS
5		382	POS
6		54 073	POS
		563 02	POS
8		3651	POS
9	1	515482	POS
0		80384	POS
	1	516048	POS
2		304798	POS
		27926	POS

# Sample	Cepas sensibles	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	267	POSITIVO
4	268	POSITIVO
5	270	POSITIVO
6	327	POSITIVO
7	330	POSITIVO
8	333	POSITIVO
9	356	POSITIVO
10	363	POSITIVO
11	368	POSITIVO
12	377	POSITIVO
13	382	POSITIVO

Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Aislados sensibles

PROTOCOL AP MYCOBAC			
THURSDAY	JULY 29 2010	8 07 PM	
SOFTWARE REVISION		GPI	3 06
SYSTEM SERIAL NUMBER			203368
TYPE		DNA EQUAL	
COUNT TIME		2 SEC	
KIT LOT NUMBER			
OPERATOR	MYCOBACTERIOLOGIA LCRSP		
 REPORT NG thresholds			
SAMPLE	DELOW	20000	NEGATIVE
BETWEEN	20000 AND	29999	
ABOVE/EQUAL		30000	POSITIVE
SAMPLE	REPL	RLU	FLAG
1	1	485911	POS
2	1	1594	NEG
3	1	515556	POS
	1	276390	POS
5	1	547021	POS
6	1	218185	POS
7	1	2 6	
8	1	75174	POS
9	1	0 938	POS
10	1	305861	POS
11	1	01311	POS
12	1	72636	POS
13	1	83947	POS

# Sample	Cepas sensibles	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	386	POSITIVO
4	397	POSITIVO
5	398	POSITIVO
6	400	POSITIVO
7	402	Zona de incertidumbre
8	404	POSITIVO
9	406	POSITIVO
10	408	POSITIVO
11	414	POSITIVO
12	415	POSITIVO
13	425	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Aislados sensibles

REPORTING THRESHOLDS				
SAMPLE	REPL.	RLU	FLAG	RELATIVI
BELOW		00 0		NEGATIV
BETWEEN		20000	D	
ABOVE/EQUAL				30000 POSITIV
		--	--	
SAMPLE	REPL.	RLU	FLAG	RELATIVI
1	1	701 2	POS	
2	1	119	NEG	
3	1	5 253	POS	
4	1	06910	POS	
5	1	3882	POS	
6	1	0039	POS	
7	1	7 636	POS	
8	1	129329	POS	
9	1	6 67	POS	
10	1	7083	POS	
11	1	7681	POS	
12	2	0	POS	

# Sample	Cepas sensibles	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	427	POSITIVO
4	432	POSITIVO
5	437	POSITIVO
6	441	POSITIVO
7	462	POSITIVO
8	465	POSITIVO
9	471	POSITIVO
10	472	POSITIVO
11	474	POSITIVO
12	498	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

**Identificación molecular del complejo *M. tuberculosis* del grupo de  
aislados MDR**

**Aislados MDR**

XXXX XXX XXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX	XXXX XXXX		
PROTOCOL 4 AP MYCOBAC			
TUESDAY JULY 20 2010	5 15 PM		
SOFTWARE REVISION GP1	3 06		
SYSTEM SERIAL NUMBER	203368		
TYPE DNA EQUAL			
COUNT TIME 2 SEC			
KIT LOT NUMBER			
OPERATOR MYCOBACTERIOLOGIA LCRSP			
REPORTING THRESHOLDS			
SAMPLE BELOW 20000	NEGATIVE		
BETWEEN 20000 AND 29999	+/-		
ABOVE/EQUAL 30000	POSITIVE		
-			
SAMPLE	REPL	RLU	FLAG
1	1	203786	POS
2	1	394807	POS
3	1	379855	POS
4	1	550026	POS
5	1	410688	POS
6	1	511384	POS
7	1	322270	POS
8	1	403445	POS
9	1	477042	POS
10	1	474986	POS
11	1	384806	POS
12	1	337003	POS
13	1	719	NEG
14	1	410210	POS

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo <i>M. tuberculosis</i>
1	0201	POSITIVO
2	0202	POSITIVO
3	0203	POSITIVO
4	0204	POSITIVO
5	0205	POSITIVO
6	0206	POSITIVO
7	0207	POSITIVO
8	0208	POSITIVO
9	0209	POSITIVO
10	0301	POSITIVO
11	0303	POSITIVO
12	0305	POSITIVO
13	Ctrl NEG	NEGATIVO
14	Ctrl POS	POSITIVO

**Nota**

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Aislados MDR

PPOTOCOL 4 AP MYCOBAC			
MONDAY	JULY 26 2010	3 36 PM	
SOFTWARE REVISION		GPI	3 06
SYSTEM SERIAL NUMBER			203368
TYPE		DNA EQUAL	
COUNT TIME		2 SEC	
KIT LOT NUMBER			
OPERATOR	MYCOBACTERIOLOGIA LCRSP		
--	--	--	--
REPORTING THRESHOLDS			
SAMPLE			
BELOW	20000		NEGATIVE
BETWEEN	20000 AND	29999	+/-
ABOVE/EQUAL		30000	POSITIVE
--	--	--	--
SAMPLE	REPL	RLU	FLAG
1	1	282847	POS
2	1	1679	NEG
3	1	516458	POS
4	1	519110	POS
5	1	486450	POS
6	1	522515	POS
7	1	134059	POS
8	1	473977	POS
9	1	320276	POS
10	1	492203	POS
11	1	403662	POS
12	1	459644	POS
13	1	241890	POS

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	0308	POSITIVO
4	0307	POSITIVO
5	0308	POSITIVO
6	0309	POSITIVO
7	0311	POSITIVO
8	0313	POSITIVO
9	0314	POSITIVO
10	0315	POSITIVO
11	0316	POSITIVO
12	0317	POSITIVO
13	0403	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Aislados MDR

X	XX	XX	
PROTOCOL AP MYCOBAC			
JEDNESDAY JULY 21 2010	8 10 AM		
SOFTWARE REVISION	GPI	3 06	
SYSTEM SERIAL NUMBER		203368	
TYPE	DNA EQUAL		
COUNT TIME	2 SEC		
KIT LOT NUMBER			
OPERATOR	MYCOBACTERIOLOGIA LCSP		
--	--	J	
REPORTING THRESHOLDS			
SAMPLE	20000	NEGATIVE	
BELOW	20000 AND		
BETWEEN	29999		
ABOVE EQUAL	30000	POSITIVE	
--	--		
SAMPLE	REPL	RLU	FLAG
1	1	371231	POS
2	1	5051	NEG
3	1	2151	POS
5	1	80880	POS
5	1	83052	POS
6	1	65168	POS
7	1	474596	POS
8	1	497195	POS
9	1	462210	POS
10	1	3992	POS

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	0401	POSITIVO
4	0402	POSITIVO
5	0404	POSITIVO
6	0410	POSITIVO
7	0505	POSITIVO
8	0601	POSITIVO
9	0602	POSITIVO
10	0604	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Aislados MDR

PROTOCOL 4 AP MYCOBAC			
WEDNESDAY JULY 28 2010	6 18 PM	6 23 PM	
SOFTWARE REVISION	GPI 3 06	GPI	3 06
SYSTEM SERIAL NUMBER	203368	203368	
TYPE	DNA EQUAL		
COUNT TIME	2 SEC		
KIT LOT NUMBER			
OPERATOR	MYCOBACTERIOLOGIA LCRSP		
REPORTING THRESHOLDS			
SAMPLE			
BELOW	20000	NEGATIVE	
BETWEEN	20000 AND	29999	/
ABOVE/EQUAL	30000	POSITIVE	
REPORTING THRESHOLDS			
SAMPLE	REPL	RLU	FLAG
1	1	96747	POS
2	1	16528	NEG
3	1	438467	POS
4	1	520315	POS
5	1	488971	POS
6	1	445711	POS
7	1	440227	POS
8	1	416244	POS
9	1	553949	POS
10	1	446047	POS
11	1	458628	POS
12	1	449903	POS
13	1	537002	POS

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
1	0405	POSITIVO
2	0407	POSITIVO
3	0409	POSITIVO
4	0411	POSITIVO
5	0412	POSITIVO
6	0501	POSITIVO
7	0503	POSITIVO
8	0506	POSITIVO
9	0603	POSITIVO
10	0605	POSITIVO
11	0606	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Aislados MDR

PROTOCOL 4 AP MYCOBAC			
WEDNESDAY JULY 28 2010	6 47 PM	CP1	3 06
SOFTWARE REVISION			
SYSTEM SERIAL NUMBER			203368
TYPE	DNA EQUAL		
COUNT TIME	2 SEC		
KIT LOT NUMBER			
OPERATOR	MYCOBACTERIOLOGIA LCSP		
— — — —	— — — —		
REPORTING thresholds			
SAMPLE			
BELOW	20000		NEGATIV
BETWEEN	20000 AND	29999	
ABOVE/EQUAL		30000=POSITIVE	
— — — —	— — — —		
SAMPLE	REPL	RLU	FLAG
1	1	559218	POS
2	1	2122	NEG
3	1	488964	POS
4	1	158116	POS
5	1	50 967	POS
6	1	531570	POS
7	1	511090	POS
8	1	497731	POS
9	1	499744	POS
10	1	70388	POS
11	1	515701	POS
12	1	73809	POS
13	1	52 252	POS

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	0607	POSITIVO
4	0608	POSITIVO
5	0609	POSITIVO
6	0702	POSITIVO
7	0703	POSITIVO
8	0707	POSITIVO
9	0708	POSITIVO
10	0801	POSITIVO
11	0802	POSITIVO
12	0803	POSITIVO
13	0804	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Aislados MDR

XIX	XIV-XL	XV-X	XVI-XVII
<b>PPOTOCOL 4 AP MYCOBAC</b>			
WEDNESDAY JULY 28 2010 7:06 PM			
SOFTWARE REVISION	GPI	3 06	
SYSTEM SERIAL NUMBER		203368	
TYPE	DNA EQUAL		
COUNT TIME	2 SEC		
KIT LOT NUMBER			
OPERATOR	MYCOBACTERIOLOGIA LCSP		
-----			
REPORTING thresholds			
SAMPLE			
BELOW	20000		NEGATIVE
BETWEEN	20000 AND	29999	
ABOVE/EQUAL		30000	POSITIVE
-----			
SAMPLE	REPL.	RLU	FLAG
1	1	458569	POS
2	1	1519	NEG
3	1	1171	NEG
4	1	468773	POS
5	1	914355	POS
6	1	501458	POS
7	1	96195	POS
8	1	543431	POS
9	1	479650	POS
10	1	533848	POS
11	1	4 7 64	POS
12	1	490831	POS

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	Ctrl NEG asa	NEGATIVO
4	Mono	POSITIVO
5	0902	POSITIVO
6	0903	POSITIVO
7	0904	POSITIVO
8	0905	POSITIVO
9	0906	POSITIVO
10	0907	POSITIVO
11	0908	POSITIVO
12	0909	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

➤ **EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO UTILIZANDO EL KIT COMERCIAL DE QIAGEN**

Se empleó el Kit comercial de columna de QIAamp DNA Mini Kit para la extracción del material genético de cada uno de los aislados

La extracción se realizó por grupos de 11 aislados más el control de extracción negativo

Cuatro (4) grupos para los aislados sensibles (control negativo) Y seis (6) grupos para los aislados MDR

**AISLADOS SENSIBLES (CONTROL NEGATIVO)**

Grupo Nº1 7 75 85 91 92 137 157 191,211 233 235

Grupo Nº2 267 268 270 327 330 333 356 303 368 377 382

Grupo Nº3 386 397 398 400 402 404 406 408 414 415 425

Grupo Nº4 427 432 437 441 462 465 471 472 474 498

**AISLADOS MDR**

Grupo N° 1

0201 0202 0203 0205 0206 0207 0208 0209 0301 0303 0305

Grupo N°2

0306 0307 0308 0309 0311 0313 0314 0315 0316 0317 0401

Grupo N°3

0402 0403 0404 0405 0407 0409 0410 0411 0412 0501 0503

**Grupo Nº4**

**0505 0506 0601 0602 0603 0604 0605 0606 0607 0608 0609**

**Grupo Nº5**

**0702 0703 0708 0707 0801 0802 0803 0804 0902 0903 0904**

**Grupo Nº6**

**0905 0906 0907 0909 0705 0908**

**Luego de la extracción se determinó la concentración de ADN (260/280nm) presente en cada una de las muestras usando el equipo BioPhotometer Eppendorf (Tabla 6)**

**TABLA 6**  
**CONCENTRACIONES DE ADN**

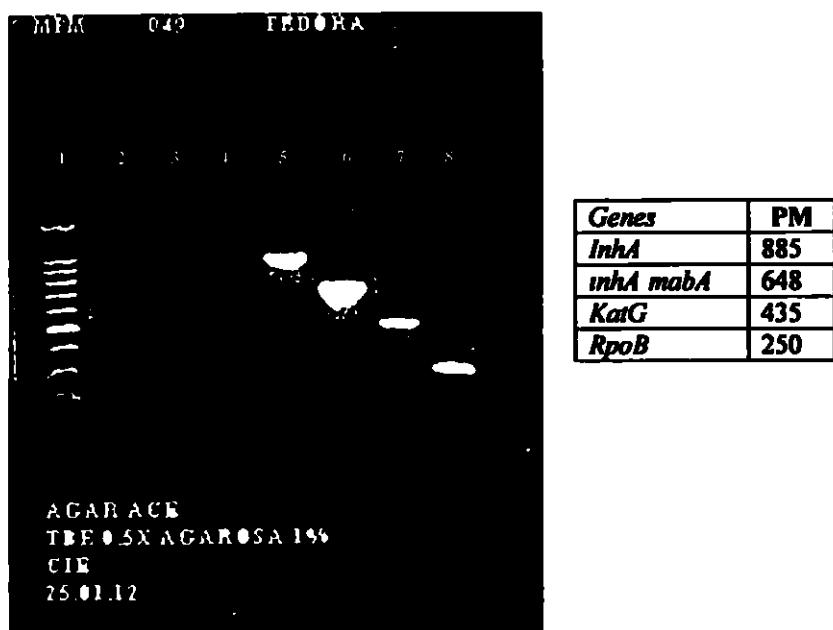
ID	μg/μl	ID	μg/μl	ID	μg/μl
0201	5 1	0603	12 9	7	14 9
0202	7 2	0604	40 1	91	12 4
0203	3 8	0605	120 6	92	11 7
0205	2 4	0606	40 5	137	22 7
0206	21 3	0607	34 4	157	11 2
0207	13 7	0609	45 1	191	11 2
0208	4 3	0610	6 7	211	14 1
0209	68 8	0611	3 9	235	27 3
0301	3 3	0702	23 3	267	31 9
0303	4 8	0703	5 8	268	11 0
0304	7 1	0704	8 2	270	34 1
0305	30 3	0705	4 1	327	45 4
0306	3 3	0706	6 6	330	13 4
0307	9 2	0707	37 7	333	30 1
0308	90 2	0708	7 3	363	17 5
0309	52 5	0801	6 4	377	12 8
0311	14 8	0802	37 2	382	17 3
0313	28 7	0803	36 5	386	70 7
0314	8 8	0804	41 9	397	13 8
0315	6 2	0805	4 5	400	39 2
0316	22 2	0902	8 8	402	68 5
0317	4 2	0903	12 9	404	85 4
0401	5 1	0904	11 8	406	104 5
0402	17 8	0906	29 1	425	11 1
0403	20 8	0907	23 5	427	19 5
0404	17 4	0908	13 3	432	73 4
0405	36 4	0909	17 1	437	22 6
0407	13 6	1005	11 0	441	21 8
0408	4 6	1006	12 9	462	37 7
0410	42 3	1007	11 4	465	28 2
0411	46 5	1101	15 2	498	75 1
0412	18 1				
0501	24 5				
0503	15 6				
0505	16 2				
0601	39 3				
0602	20 3				

➤ **AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *katG*, *inhA*, *inhA-mabA* Y *rpoB* INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A ISONIACIDA Y RIFAMPICINA, RESPECTIVAMENTE**

Los productos de amplificación de cada uno de los genes en estudio de los 98 aislados fueron evaluados en base a su peso molecular en gel de agarosa al 1% y TBE 0.5X

A continuación los mismos pueden diferenciarse utilizando el marcador de peso molecular como se observa en la Figura 8

**Figura 8**



**Figura 8** Productos de amplificación de los genes *inhA*, *inhA mabA*, *katG* y *rpoB*  
Carril 1 marcador de peso (100bp DNA Ladder / Promega)  
Carril 5 gen *inhA* 885pb  
Carril 6 gen *inhA mabA* 648pb  
Carril 7 *katG* 435 pb  
Carril 8 *rpoB* 250pb

➤ **SECUENCIACIÓN DE LAS REGIONES ESPECÍFICAS DE LOS GENES *rpoB*, *katG*, *inhA*, *inhA-mabA* INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A RIFAMPICINA E ISONIACIDA DE LOS AISLADOS EN ESTUDIO E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES**

A continuación se presentan las secuencias de las regiones específicas de cada uno de los genes en estudio *katG* *rpoB* *inhA* *inhA mabA* de la cepa de Referencia H37Rv y de los aislados MDR 0202 0208 0402 0409 0605 0708 0801 1005 representativos de cada una de las mutaciones identificadas

Muestra Cepa de Referencia H37Rv

Gen *katG*

Wild Type

```
>H37Rv_KatG
GTCCCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCAACGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCCTCGTGG
GTCATATGAAATACCCCGTCAGGGCGCGAAACCAAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT
ACTGCACCAAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGCGTTGACTATGCCGCGGGAGGTGCGGACCC
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCCGGACATCGAGGAAGTGTGACCAACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCCG
ACTACGGCCACTACGGGCCGCTGTGTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA
CGGCGCGGGCGCCGGCGCCGGGGCGGATGAGCGGTTGCGCGCCCTAACAGCTGGCCGACAACGCCAGC
TTGGACAAGGCAGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGCGGACC
TGATTGTTTCGCCGGCAACTGCCGCGTGGAAATCGATGGCTTCAAGACGTTGGGTTGGCTTGGCCG
GGTCGACCAAGTGGGAGCCGATGAGGTCTATTGGGCAAGGAAGCCTGGCTGGCGATGAGCGTTAC
AGCGGTAAAGCGGGATCTGGAGAACCCGCTGGCCGCGGTGCAAGATGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCCGCGCGGTGACATTGCGAGACGTTGGCGATGGCCAT
GAACGAGCTGAAACAGCCGGCTGATCGTGGCGTCAACATTGGTAAGAACCCATGGCGCCGGCCG
GCCGATCTGGCGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGCTTGGCTGGAAGAGCTCGT
ATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACAGCAGATCGAGGTGCTATGGACGAACACCCGGAA
ATGGGACAACAGTTCTCGAGATCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGT
TGGCAATACACGCCAAGGACGGCGCCGGTGCCTGGCACCATCCGGACCCGTTGGCGGGCCAGGGCGCT
CCCCGACGATCTGGCCACTGACCTCTCGCTGCCTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGGCTCGTG
GCTGGAACACCCGGAGGAATTGGCCGACGAGTTGCCAAGGCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG
GGTCCCCTGGAGATACTTGGGCGCTGGTCCCAAGCAGACCCGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG
CGGTCAAGGCAAGGACCTCGTGGCGAAGCCGAGATTGCCAGCTTAAGAGCCAGATCCGGCATGGGATT
GACTGCTCACAGCTAGTTGACCGCATGGCGCGCTGCTGGTCCGTTAGCGACAAGCGCCG
GGCGCCAAAGGTGGTCGACATCCGCCCTGCAAGCCACAAGTCGGTGGGAGGTCAACGACCCGACGGGATC
TGGCAAGGTCAATTGCAACCCCTGGAAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGGCCGGGGAAACATCAA
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTGTGCTGGCTGTGCGCCATAGAGAAAGCAGCAAAGGGCGCTGGC
CACAAACATCACGGTGCCTTCACCCGGGGCCGACGGATGCGTGCAGGAACAAACCGACGTGGAATCCT
TTGGCGTGTGGAGGCCAAGGCAAGGAGATGGCTTCCGAAACTACCTGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGGCGA
GTACATGCTGCTGACAAGGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCTGGAGATGACGGTGTGGTAGGTGGC
CTGCGCGTCTCGGCGAAACTACAAGGCGCTTACCGCTGGCGTGTGCGCCATACGGGCTCCGAGTCAGTGA
CCAACGACTTCTCGTGAACCTGCTGACATGGGTATCACCTGGGAGCCCTGCCAGCAGATGACGGGAC
CTACCAAGGGCAAGGATGGCAAGGTAAGTGGACGGCAAGGGCTGGACCTGGTCTTCGGGTCC
AACTCGGAGTTGCGGGCGTTGTCAGGGTCAAGGTCATGGCGCCGATGACGCGCAGCGAAGTTGTCAGGACT
TCGTCGCTGCCCTGGGACAAGGTGATGAACCTGACAGGTTGACGTCAGTGCCTG
```

Aislado 0202

Gen katG

Mutación wild type

>fedora0202c\_KatG

GTGCCCAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCCGGAGCCCTAGCAACGGCTGTCCCCTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGCGGAAACCAAGGACTGGTGGCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCCGGCGTCGCTGACCGGACATCGAGGAAGTGTATGCCGGAGGTGCGGAC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCCGGACATCGAGGAAGTGTATGCCGGAGGTGCGGAC  
ACTACGGCCACTACGGGGCGCTGTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGGGCGCGCCGGGCGCATGCAGCGTTGCCGCTTAACAGCTGGCCCACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCAGCGCCGGCTGCTGTTGGCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGCGGACC  
TGATTGTTTCGCGGGCAACTGCGCCTGGAATCGATGGGCTTCAAGAACGCTTGGCTGGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAGCGGGATCTGGAGAACCGCTGGCCGGTGCAGATGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCGCGGGCGACATTGCGAGACGTTTGGCGCATGGCCAT  
GAACGACGTGAAACAGCGCGCTGATCGTGGCGGTACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCG  
GCCGATCTGGCGCCGGCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGCTGGCTGGAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACAGCAGCATCGTGGAGCTATGGACGAACACCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTCTCGAGATCTGACGGCTACGAGTGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGT  
TGGCAATACACCGCCAAGGACGGCGGGTGCCTGGGACCCATCCGGACCCGTTGGCGGGCAAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGCATTGACCTCTGCTGGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTGCGCAAGGCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCCTGGAGATACTTGGGCGCTGGTCCCCAAGCAGACCCCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGTCAGCCACGACCTCGTGGCGAACGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCTGGGATCGGATT  
GACTGTCACAGCTAGTTGACCGCATGGCGGGCGCTGCTGTTCCGTTGGTAGCGACAAGCGCGGC  
GGGCCAACGGTGGTGCATCCGCTGCAAGCCACAAGTCGGGTGGGAGGTCAACGACCCGACGGGATC  
TGGCAAGGTATTGCAACCTGGAGAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCCGGGAAACATCAA  
AGTGTCTTGCCTGGGACCTCGTCGTGCTGGTGGCTGTGCCCATAGAGAAAGCAGCAAGGCGCTGGC  
ACAACATCACGGTGCCTTCACCCGGGCGCACGGATGCGTCGCAAGGAACAAACCGACGTGGAATCCT  
TTGCGCTGGAGCCAAGGAGATGGCTCCGAAACTACCTGGAAAGGGCAACCCGTTGGCGGCGA  
GTACATGCTGCTGACAAGGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCTGGGAGATGACGGTGCTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGGCGCAAACCTACAAGCGCTTACCGCTGGGCGTGTCAACCGAGGCTCCGAGTCAGTCA  
CCAACGACTTCTCGTGAACCTGCTGACATGGGTATCACCTGGGAAGCCCTGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAAGGGCAAGGATGGCAAGGTGAAGTGGACCCGAGCCGCGTGGACCTGGTCTTGGGTC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTATGGCGCCGATGACGCCGAGCCGAAGTTGTCAGGACT  
TCGTCGCTGCCCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTGACGTGCCGCTGA

Aislado 0208  
Gen katG  
Mutación wild type

>fedora0208e\_KatG  
GTGCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCCGGAGCCCTAGCAACGGCTGTCCTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCGTCGAGGGCGGAAACCAAGGACTGGTGGCCCAACCGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGTGCGGCGTTCGACTATGCCGCGGAGGTGCGGAC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCGGACATCGAGGAAGTGATGACCACTCGCAGCCGTGGTGGCCCG  
ACTACGGCCACTACGGCCGCTGTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGCGGGCGCCGGGGCGCATGCAGCGGTCGCGCCGTTAACAGCTGGCCGACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGCGGACC  
TGATTGTTTCGCCGGCAACTGCCGCTGGAATCGATGGCTTCAAGACGTTGGGTCGGCTTGGCCG  
GGTCGACCAAGCGGGAGCCCGATGAGGTCTATTGGGCAAGGAAGCACCTGGCTCGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAAGCGGGATCTGGAGAACCCGCTGGCGCGGTGCAGATGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GCCGGAACGGCAACCCGGACCCATGGCGCGCGGTGCACATTGGCGAGACGTTGGCGATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGCGCTGATCGTCGGCGTACACTTTCGTAAGACCCATGGGCCGGCCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCGCTGGAGCAGATGGCTTGGCTGAAAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACCGATCACCAGCAGCATCGAGGTGATGGACGAACACCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTCTCGAGATCTGACGGCTACGAGTGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATAACCGCCAAGGACGGCGCCGGTGCCTGACCATCCCAGGCTTGGCGGGCAGGGCCT  
CCCCGACGATGCTGGCACTGACCTCTCGCTGCGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAAACACCCGAGGAATTGGCGACGAGTTGCCAAGGCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTCGAGATACCTTGGCGCTGGTCCCAGCAGACCCCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAAGCCACGACCTCGTCGGCGAAGCCAGATTGCCAGGCTTAAGAGCCAGATCCGGGATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTGACCGCATGGCGCGCGTGTGTTCCGTGGTAGCGACAAGCGCGGC  
GGCGCCAACGGTGGTCGATCCGCTGCAAGCCACAAGTGGTGGAGGTCAAGCAGACCCGACGGGATC  
TGCGCAAGGTCAATTGCAACCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGCCGGGAAACATCAA  
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTCGCTCGTGGCTGTGCCGCAAGAGAAAGCAGCAAAGGCGCTGGC  
CACAACATCACGGTGCCTTCACCCGGCGCACGGATGCGTCGAGGAACAAACCGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGGAGCCAAGGAGATGGCTTCCGAAACTACCTCGAAAGGGCAACCGTTGCCGCG  
GTACATGCTGCTGACAAGGCAACCTGCTACGCTAGTGCCCTGAGATGACGGTGTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGCGCAAAACTACAAGCGCTTACCGCTGGCGTGTACCGAGGCTCCGAGTCAGTGA  
CCAACGACTTCTCGTGAACCTGCTGACATGGGTATCACCTGGAGCCCTGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAAGGCAAGGATGGCAAGGTGAAGTGGACCGGGCAGCCGCGTGGACCTGGTCTCGGGTCC  
AACTCGGAGTTGCCGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCCGATGACGCCAGCCGAAGTTGTGCAAGGACT  
TCGTCGCTGCCCTGGGACAAGGTGATGAAACCTCGACAGGTTGACGTGCGCTGA

Aislado 0402  
Gen\_ katG  
Mutación\_ wild type

>fedora0402\_KatG  
GTGCCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCAACGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCCTCGTGG  
GTCATATGAAATAACCCCGTCGAGGGCGGCGAAACCCAGACTGGTGGCCCAACCGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCCGGCCGTGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTGACTATGCCGCGGAGGTGCGGAC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCCGGACATCGAGGAAGTGATGACCACTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCCG  
ACTACGGCCACTACGGGCCGTGTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGGCCGCGCCGGGCGGATGCAAGCGGTTGCGCCGCTTAACAGCTGGCCGACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCAGCCGGCTGCTGTCGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACC  
TGATTGTTTCGCCCCGCACTGCGCGCTGGAATCGATGGCTTCAAGACGTTGGGTTGGCTTGGCCG  
GGTCGACCAAGTGGGAGCCGATGAGGTCTATTGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAAGGGGATCTGGAGAACCGCTGGCGCGGTGCAAGATGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGCCAACCCGACCCATGGCGCGCCGGTCAACATTGCGAGACGTTGGCGATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGCGCTGATCGTGGCGGTCAACACTTGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCGAACCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACAGCAGATCGAGGTCGATGGACGAACACCCGACGAA  
ACGGGACAACAGTTCTCGAGATCCTGTAACGGTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATACACCGCCAAGGACGGCGCGGTGCCGGCACCATCCGGACCCGTTGGCGGGCAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGTCACTGACCTCTCGCTGGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGGTCGCTG  
GCTGGAACACCCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTGCCAAGGCCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTGCGAGATACTTGGGCCGCTGGTCCCAGCAGACCCGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAGCCACGACCTCGTGGCGAACCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGGATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGTAGTTGACCGCATGGCGCGCTGCTGTTGGTAGCGACAAGCGCCG  
GGCGCCAACGGTGGTCGATCCGCTGCAAGCCACAAGTCGGTGGAGGTCAACGACCCGACGGGATC  
TGCACAGGTCACTCGACCCCTGGAAAGAGATCCAGGACTCATTCAACTCCGCGCCGGGAAACATCAA  
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTGTGCTGGTGGCTGTGCCGCAAGAGAAAGCAGAAAGGGCGCTGGC  
CACAAACATCACGGTGCCCTCACCCGGCCGACGGATGCGTCGAGGAACAAACGACGTGGAATCCT  
TTGCGTGTGGAGCCAAGGCAAGGAGATGGCTTCCGAAACTACCTCGGAAAGGGCAACCCGTTGGCGGCGA  
GTACATGCTGTCGACAAGGCAACCTGCTACGCTAGTGGCCCTGAGATGACGGTGCTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGGCCAAACTACAAGCGCTTACCGCTGGCGTGTGTTACCGAGGCGTCCGAGTCAGTGA  
CCAACGACTCTTCGTGAACCTGCTGACATGGGTATCACCTGGAGCCCTGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAAGGGCAAGGATGGCAAGGTGAAGTGGACCCGGCAGCCGTGGACCTGGTCTTGGTCC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGTTGTCGAGGTCTATGGCGCCGATGACGGCGCAGCCGAAGTGTGCAAGGACT  
TCGTCGCTGCCCTGGACAAGGTGATGACCTCGACAGGTTGACGTGCGCTGA

Aislado 0409

Gen katG

Mutación S315T (AGC → ACC)

>fedora8409\_KatG  
GTGCCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCAACGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCCTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGGAAACCAGGAATGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTGACTATGCCGCGGAGGTGCGACC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCCGGACATCGAGGAAGTGAATGACCACTCGCAGCCGTGGTGGCCCCCG  
ACTACGGCAACTACGGGCCGCTGTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGGCCGCGCCGGCGCATGCAAGCGGTTGCGCCGCTTAACAGCTGGCCGACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGCGGACC  
TGATTGTTTCGCCGGCAACTGCGCCTGGAATGATGGGCTTCAAGACGTTGGGTTGGCTTGGCCG  
GGTCGACCAAGTGGAGCCGATGAGGTCTATTGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTGGCATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAAGCGGGATCTGGAGAACCCGCTGGCCGGTGCAGATGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCATGGCCGCGCGGTGACATTGCGAGACGTTGGCGCATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGCGCTGATGTCGGCGTACACTTCGTAAGACCCATGGCGCCGGCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCGAACCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACCGATCACCACCGATCGAGGTGATGGGACGAAACCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTCTCGAGATCTGACGGCTACGAGTGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATAACCCGCCAAGGACGGCGCCGGTGCCTGGCACCATCCGGACCCGTTGGCGGGCCAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGCCACTGACCTCTCGCTGCCGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCGAGGAATTGGCGACGAGTTGCCAAGGCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCCTTGCAGGATACCTGGCCGCTGGTCCCAAGCAGACCTGCTGTTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAAGCCACGACCTCGCGCGAACGCCAGATTGCCAGCCCTAAAGAGCCAGATCCGGCATGGGATT  
GACTGTCTCACAGTAGTTGACCGCATGGCGGGCGTCGTTCCGGTGGTAGCGACAAGCGCGC  
GGCGCCAACGGTGGTCGATCCGCTGCAAGGCCACAAGTCGGGTGGAGGTCAACGACCCGACGGGATC  
TGCAGCAAGGTCAATTGCAACCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCCGGGAACATCAA  
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTCGCTGGTGGCTGTGCCCATAGAGAAAGCAGCAAAGCGGCTGGC  
ACAACATCACGGTGCCCTCACCCGGGCCGACGGATGCGTCGAGGAACAAACGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCAAGGAGATGGCTTCCGAAACTACCTGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGGCGA  
GTACATGCTGCTGACAAGGCGAACCTGCTACGCTAGTGCCTGAGATGACGGTGTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGGCCTACAGCGCTTACCGCTGGCGTGTTCACCGAGGCTCCGAGTCAGTGA  
CCAACGACTTCTCGTGAACCTGCTGACATGGGTATCACCTGGGAGCCCTGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCCAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCGGAGCCGCTGGACCTGGTCTTGGTCC  
AACTCGGAGTTGCCGGCGTTGTCGAGGTCTATGGCGCCGATGACGCGCAGCCGAAGTTCGTGAGGACT  
TCGTCGCTGCCGGACAAGGTGATGAACCTGACAGGTTGACGTCGCTGA

Aislado 0605

Gen katG

Mutación S315T (AGC → ACC)

>fedora0605\_KatG

GTGCCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCAACGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCGTCGAGGGCGCGAAACCAAGGACTGGTGGCCCAACCGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGGCGTTGACTATGCCGCGAGGTGCGGACC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCCGACATCGAGGAAGTGATGACCAACCTCGCAGCCGTTGGCCCG  
ACTACGGCCACTACGGGCCGCTGTTATCCGGATGGCGTGGCACCGTCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGCCGCCGCCGGGGCGCATGCAAGCGGTTGCGCCGCTTAACAGCTGGCCCACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTATGGGCGGACC  
TGATTGTTTCGCCGGCAACTGCGCGCTGGAATGATGGGCTTCAAGACGTTGGGTTGGCTTCGGCCG  
GGTCGACCAGTGGGAGCCGATGAGGTCTATTGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAAGCGGGATCTGGAGAACCCGCTGGCCGCGGTGCAAGATGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGGAACCCGGACCCCATGGCCGCGCGTGCACATTGCGAGACGTTCGCGCATGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGCGCTGATGTCGGCGGTACACTTCGTAAGACCCATGGCGCCGCCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCGAACCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGGCATCAC<sub>1</sub> ACC<sub>2</sub> GCACTGAGGTGCTATGGACGAACACCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATACACCGCCAAGGACGGCGCCGGTGCCTGGCACCACCGGACCCGTTGGCGGGCAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGCCACTGACCTCTCGCTGCCGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCGAGGAATTGGCGACGAGTTGCTGCAAGGCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTGCGAGATACTTGGCCGCTGGTCCCCAAGCAGACCCGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAGCCACGACCTCGTCGGCGAGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCTGGCATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTGACCGCATGGCGCGCTGCTGTTCCGTTAGCAGAAGCGCAG  
GGCGCCAACGGTGGTCGATCCGCTGCAGCCACAAGTGGGTGGAGGTCAACGACCCGACGGGATC  
TGCACAGGTCAATTGCAACCGTGGAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGCGCCGGGAACATCAA  
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTCGCTCGTGGCTGCGCCATAGAGAAAGCAGCAAAGGCGGCTGGC  
ACAACATCACGGTGCCCTCACCCGGCGCACGGATGCGTCGAGGAACAAACGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCAAGGCAAGATGGCTCCGAAACTACCTGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGCCGA  
GTACATGCTGCTGACAGGCAACCTGCTACGCTAGTGCCTGAGATGACGGTGTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGCGCAAAACTACAAGCGCTTACCGCTGGCGTGTGACCGAGGCTCGAGTC  
CCAACGACTTCTCGTAACCTGCTGACATGGGTATCACCTGGAGGCCCTGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCGGCAGCCGCGTGGACCTGGTCTTCGGTCC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTCTATGGGCCGATGACGCGCAGCCGAAGTTGTCAGGACT  
TCGTCGCTGCCCTGGGACAAGGTGATGAACCTGACAGGTTGACGTGCGCTGA

Aislado 0708  
Gen katG  
Mutación wild type

>fedora0708c\_KatG  
GTGCCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCAACGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCCTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGCGGAAACCAGGACTGGTGCCCCAACGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTGACTATGCGCGGAGGTGCGGACCC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACCGGGACATCGAGGAAGTGTGACCACTCGCAGCCGTGGTGGCCCCGCG  
ACTACGGCCACTACGGGGCGCTGTTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGGCCGGCGCCGGGGGGCGGATGCGAGCGTTGCGGCCGTTAACAGCTGGCCCGACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCAGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGCGGACC  
TGATTGTTTCGCCGGCAACTGCGCGCTGGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTGGCTGGCGATGAGCGTTAC  
GGTCGACCAAGTGGGAGCCGATGAGGTCTATTGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTGGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAAGCGGGATCTGGAGAACCCGCTGGCCGCGGTGAGATGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCGGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCCGCGGCGTGCACATTGCGAGACGTTGGCTGGCGATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGGCGTGTGACGTCGCGCGTCAACACTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCC  
GCCGATCTGGTCGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTGGAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACI AGC :GCATCGAGGTGATGGACGAACACCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTTCTCGAGATCTGTACGGCTACGAGTGGAGGTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGT  
TGGCAATACACCGCCAAGGACGGCGCCGGTGCCTGGGACCATCCGGACCCGTTGGCGGGCAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGCACTGACCTCTCGCTGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACCGCTCGCTG  
GCTGGAAACACCCGAGGAATTGGCGACGAGTTGCGCAAGGCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCCTGCGAGATACTTGGGGCGCTGGTCCCCAAGCAGACCCCTGCTGTGGCAGGATCCGGCTCTG  
CGGTCAGCCACGACCTCGTCGGCGAAGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGCAGTCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTGACCGATGGCGGGCGTGTGCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGCGCCAACGGTGGTCGATCCGCCCTGCAAGCCACAAGTCGGGTGGAGGTCAACGACCCGACGGGATC  
TGGCAGGTCAATTGCAACCTGGAAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCCGGGAAACATCAA  
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTCGTGCTCGGTGGCTGTGCGCCATAGAGAAAGCAGCAAAGGGCGCTGGC  
CACAAACATCACGGTGCCCTCACCCGGGCCACGGATGCGTCGAGGAACAAACCGACGTGGAAATCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCCAAGGCAAGGAGATGGCTCCGAAACTACCTGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGGCGA  
GTACATGCTGCTGACAAGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCCTGAGATGACGGTGCTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGCGCAAACATCACAGCGCTTACCGCTGGCGTGTGCTGGAGGCTCCGAGTCAGTGA  
CCAACGACTTCTCGTGAAACCTGCTGACATGGGTATCACCTGGGAGCCCTGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAAGGGCAAGGATGGCAAGGTGAAGTGGACGGCAGCCGCTGGACCTGGTCTTCGGGTC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCCGATGACGCCAGCCGAAGTTGCGAGGACT  
TCGTCGCTGCCCTGGGACAAGGTGATGAAACCTCGACAGGTTGACGTGCGCTGA

Aislado 0801  
Gen katG  
Mutación wild type

>fedora0801c\_KatG  
GTGCCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCAACGGAGCCCTAGCAACGGCTGTCCCGTCGTGG  
GTCAATGAAATACCCCGTCAGGGCGCGGAACACAGGACTGGTGGCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCGGGCGTCGTGACCCGATGGGTGCGGCGTTGACTATGCCGCGGAGTCGCACCC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCCGAGCATCGAGGAAGTGATGACCACTCGCAGCCGTGGTGGCCCCCG  
ACTACGGCCACTACGGGCCGTGTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGCGGCCGGCGGGCATGCAAGGGTTCGCGCCGCTAACAGCTGGCCCACAAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCAGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGCGGACC  
TGATTGTTTCGCCGGCAACTGCGCCTGGAATCGATGGGCTCAAGACGTTGGGTTGGCTGGCCG  
GGTCGACCAAGTGGGAGCCGATGAGGTCTATTGGGCAAGGAAGCACCTGGCTCGGCATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAGCGGATCTGGAGAACCGCTGGCCGGTGCAGATGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCGAACGGCAACCCGGACCCATGGCCGCGCGGTGACATTGCGAGACGTTGGCGATGGCCATGGC  
GAACGACGTCGAAACAGCGCGCTGATCGTCGGCGGTACACATTGGTAAGACCCATGGCGCGGCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCCGAAACCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCGAACCGGTAGGACGGATCACAGCGATGCGAGGTCGATGGACGAACACCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTCTCGAGATCTGTACGGCTACGAGTGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATACACCGCAAGGACGGCGCCGGTGCAGGACCCATCCGGACCCGTTGGCGGGCCAGGGCGT  
CCCCGACGATGCTGGCACTGACCTCTCGCTCGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTGCCAAGGCCCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCCTGCGAGATACTTGGGCCGCTGGTCCCCAAGCAGACCCCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGTCAGCCACGACCTCGTCGGCGAACGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGCATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTGACCGATGGCGGGCGCTGCTGTTCCGTGGTAGCGACAAAGCGCGGC  
GGCGCAACGGTGGTCGATCCGCTGCAAGCAGACCCCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
TCCGCAAGGTCACTCGCACCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGCCGGGAAACATCAA  
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTCGCTGCTCGGTGGCTGTGGCCATAGAGAAAGCAGCAAAAGGGCGCTGGC  
CACAACATCACGGTGCCCTTCACCCCGGGCCACGGATGCGTCGAGGAACAAACGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCCAAGGCAAGGAGATGGCTTCCGAAACTACCTCGGAAAGGGCAACCGTTGCCGGCGA  
GTACATGCTGCTCGACAAGGCAACCTGCTTACGCTCAGTGCCCCCTGAGATGACGGTGCTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCCTCGCGCAAAACTACAAGCGCTACCGCTGGCGTGTTCACCGAGGCTCCGAGTCAGTGA  
CCAACGACTTCTCGTGAACCTGCTGACATGGTATCACCTGGGAGCCCTCGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCGGCAGCCGCGTGGACCTGGTCTTCGGTCC  
AACTCGGAGTTGCCGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCCGATGACGCGCAGCCGAAGTTCGTGAGGACT  
TCGTGCTGCCCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTGACGTGCGCTGA

Aislado 1005

Gen kaiG

Mutación S315T (AGC →ACA)

>fedora1005\_KaiG  
GTGCCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCCGGAGCCCTAGCAACGGCTGTCCCCTCGTGG  
GTCAATGAATAACCCGTCGAGGGCGCGAAACCAAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCCGGCGTCGTGACCCGATGGGTGCGCGTTGACTATGCCGCGGAGGTGCGGAC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCCGGACATCGAGGAAGTGTATGACCACTCGCAGCCGTGGTGGCCCCGCG  
ACTACGGCCACTACGGGCCGTGTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGCGCGCCGGGGCGCATGACGGTTCGCCGGCTTAACAGCTGGGCCAACGCGGAC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACCGCAAGAAGCTCTCATGGGCCGACC  
TGATTGTTTCGCCGGCAACTGCGCCTGGAATCGATGGCTTCAAGACGTTGGGTTGCCGTTGCCG  
GGTCGACCAAGTGGGAGCCCGATGAGGTCTATTGGGCAAGGAAGCACCTGGCTGCCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAGCGGGATCTGGAGAACCCGCTGGCCGGTGCAGATGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCATGGCCGCCGGTGCACATTGCGAGACGTTGCCGATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGCGCTGATGTCGCCGGTACACTTCCGTAAGACCCATGGCCGCCGGCCG  
GCCGATCTGGTCCGCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAAGATGGGCTTGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACCAACGATCGAGGTGTATGGACGAACACCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTCTCGAGATCTGACGGTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGCCGCT  
TGGCAATACACCGCCAAGGACGGCGCCGGTGCCGGCACCATCCGACCCGTTGCCGGGCAAGGGCGT  
CCCCGACGATGCTGCCCACTGACCTCTGCTGCCGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCT  
GCTGGAACACCCGAGGAATTGGCGACGAGTTGCCAAGGCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTCGAGATACCTGGCCGCTGGTCCCAAGCAGACCTGCTGCCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAGCCACGACCTCGCCGGCAAGCCGAGATTGCCAGGCTTAAGAGCCAGATCCGGGATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTGACCGCATGGCGGGCGTGTGTTCCGTTGGTAGCGACAAGCGCCGC  
GGCGCCAACGGTGGTCCATCCGCTGCCAGCCACAAGTGGGTGGAGGTCAACGACCCGACGGGATC  
TGCACAGGTCTTCGACCTCGTCGCTCGTGGCTGTGCCGCTAGAGAAAGCAGAAAGGCGCTGGC  
CACAAACATCACGGTGCCCTCACCCGGGCCACGGATGCCGAGGAACAAACGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCAAGGCAAGGAGATGGCTTCCGAAACTACCTCGAAAGGGCAACCGTTGCCGCC  
GTACATGCTGCTGACAAGGCAACCTGCTACGCTAGTGCCCTGAGATGACGGTGTGGTAGGTGGC  
CTGCCGCTCTCGGCCAAACTACAAGCGCTTACCGCTGGCGTGTGTTACCGAGGCCCTCCGAGTCACTGA  
CCAACGACTTCTCGTGAACCTGCTCGACATGGTATCACCTGGAGCCCTGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAAGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCCGGCAGCCGCGTGGACCTGGTCTCGGGTCC  
AACTCGGAGTTGCCGGCGCTTGTGAGGTCTATGGGCCGATGACGCCGAGCCGAAGTTCGTGCAGGACT  
TCGTCGCTGCCCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTGACGTGCGCTGA

**ALINEAMIENTO MULTIPLE DE LAS SECUENCIAS DEL GEN *katG***  
**UTILIZANDO LA HERRAMIENTA CLUSTAL W**

H37Rv_KatG	AAGAGCTGTATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTGTA
fedora0402_KatG	AAGAGCTGTATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTGTA
fedora0202c_KatG	AAGAGCTGTATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTGTA
fedora0208e_KatG	AAGAGCTGTATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTGTA
fedora0708c_KatG	AAGAGCTGTATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTGTA
fedora0801c_KatG	AAGAGCTGTATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTGTA
fedora0409_KatG	AAGAGCTGTATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACCACCGGCATCGAGGTGTA
fedora1005_KatG	AAGAGCTGTATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACCACAGGCATCGAGGTGTA
fedora0605_KatG	AAGAGCTGTATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCACCACCGGCATCGAGGTGTA ***** *****

## Muestra H37Rv

### Gen rpoB

Wild Type

>H37Rv\_RpoB

TTGGCAGATTCCCGCCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCCCTAGTCGGAGTCGCCGCAAAGTTCTCGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCAAACCGGGTCTCTCGCTAAGCTGCAGGAACCACTTGAGGTTCCGGGACT  
CTTGTACGTCAGACGGATTCTCGACTGGCTGATCGGTTGCCCGGCTGCCGAAATCCGCCCGAG  
CGGGGTGATGTCACCCAGTGGGTGGCTGAGGGTGTCTACGAGCTGTCCTCGATCGAGGACTTCT  
CCGGGTGATGTCGTTCTCTGACCTCGTTTCGACGATGTCAGGCACCCGTCACGAGTGAA  
AGACAAGGACATGACGTACGCCCTCCACTGTTCTCACCGCCAGGTATCAACAAACACCCTGAG  
ATCAAGAATCAGACGGTTCATGGGTGACTTCCCAGTGTGATGACCGAGAAGGGCACGTTATCATCAACG  
GGACCGAGCTGGGGTGGCTAGCCAGCTGGCTGCCCGGGGTGACTTCGACGAGACCAATTGACAA  
GTCACCGACAAGACGCTGACAGCTGAGGTGATCCGAGCCGGCGCTGGCTGAGTTGACGTC  
GACAAGCCGACACCGTGGCTGCGCATGACCGCAAACGCCGAAACCCGGTACCGTGTGTCAGG  
CGCTGGGCTGGACCAAGCGAGATTGTCGAGCGGGTCTCCGAGATCATGCGATCGACGCTGGA  
GAAGGACAACACCGTGGCACCGACGAGGGCTGTTGGACATCTACCGCAAGCTGGCTCCGGGAGCCC  
CCGACCAAAGAGTCAGCGAGACGCTGTTGGAAAACCTGTTCAAGGAGAACGGCTACGACCTGGCC  
GCGTCGGTCGCTATAAGGTCACAAGAAGCTGGGCTGCACTGTCGGGAGGCCATACGTCGTCAGGCT  
GACCGAAGAAGACGTCGTCGGCACCATCGAAATATCTGGTCGCTGACGAGGGTACGACCATGAC  
GTTCCGGGCGGCGTCGAGGTGCCGGTGGAAACCGACGACATCGACCACTTCGGCAACCGCCCTCGTA  
CGGTCGGCGAGCTGATCCAAAACAGATCCGGTGGCATGTCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCG  
GATGACCAACCCAGGACGCTGGAGGCATCACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCGGTGGTCCGGCG  
ATCAAGGAGTTCTCGGCACCAAGCCAGCTGAGCCAATTCACTGACI\_AGAACAACCCGCTGTCGGGTTGA  
C(CAC)AGCGCCGACTTCG-XGCTGGGGCCCGGCGGTCTGT(LAL)GAGCTGTCGGGCTGGAGGGTCCG  
CGACGTCACCCCGTCGCACTACGGCGGATGTGCCCAGTCGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGCTG  
ATCGGCTCGTGTGCGGTGACCGCGGGTCAACCGTGTGGGTTCATCGAAACCGCTGGGAGGGTGG  
TCGACGGCGTGGTTAGCGACGAGATCGTGTACCTGACCGCCGACGAGGGAGGCCACGTGGTGGACA  
GGCCAAATTCCGCGATCGGAGCGTCTCTCGTGGAGGACTACATGGACGTCGCCCCCGCCAGATGGTGTGG  
GAGGTGGAGTAGCTGCCCCCTGCTGGAGGACTACATGGACGTCGCCCCCGCCAGATGGTGTGG  
CCACCGCGATGATTTCTCGGAGCACGACGACGCCAACCGTGCCTCATGGGGCAACATGACG  
CCAGCGGTGCGCTGGTCCGTAGCGAGGCCGCTGGTGGGACCGGGATGGAGCTGCGCGGGCATC  
GACGCCGGCAGCTGCTGCGTGGCGAACGAAACGGCGTCACTGAGGGAGGTGTGCGCCGACTACATCACTG  
TGATGACGACAAACGGCACCCCGTCACTACCGGATGCGCAAGTTGCCCCGTCACACGGCACTTG  
CGCCAACCGATGCCCCATCGGACGCGGCCGACCGAGCTGCGAGGCCGGTCAAGGTGATCGCCGACGGTCCC  
TGTACTGACGACGGCGAGATGGCGTGGCAAGAACCTGCTGGTGGCCATCATGGCGTGGGAGGGCACA  
ACTACGAGGACGCGATCATCTGTCACCGCTGGTCAAGAAGAACGCTGTCACCTGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGATCGATGCTCGCAGACACCAAGCTGGGTGGAGGAGATCACCGCGACATCCCACATC  
TCCGACGAGGTGCTCGCGACCTGGATGAGCGGGGATCGTGCCTGCGACGGTGGGAGGGACGGGG  
ACATCTGGTQGGCAAGGTACCCCGAAGGGTGAGACCGAGCTGACGCCGGAGGAGCGGTGCTGCGTGC  
CATCTCGGTGAGAAGGCCGCGAGGTGCCGACACTTCGCTGAAGGTGCCGACGGCGAATCCGGCAAG  
GTGATCGGATTCGGGTGTTTCCCGCGAGGACGAGGACGAGTTGCCGGCGGTGTCACGAGCTGGTGC  
GTGTTATGTGGCTCAGAAAAGCAAGATCTCGACGGTACAAGCTGGCGGGGACGGCAACAGGG  
CGTGTGGCAAGATCTGCGGGTTGAGGACATGCCGTTCTGCCACGGCACCCGGTGGACATTATT  
TTGAACACCCACGGCGTGGCGACGGATGAAACATCGCCAGATTGGAGACCACTGGGTGGTGTG  
CCCACACGGCTGGAGGTGACGCCGCAAGGGGTTCCGACTGGCGCCAGGCTGCCGACGAACT  
GCTCGAGGGCGAGCCAGCCATTGTCGACGCCGGTGTGACGCCGCCAGGAGGGCGAGCTGCGAG  
GCCCTGGTGTGCGACGCTGCCAACCGCGACGGTGAAGCTGCTGGTGCACGCCGACGGCAAGGCCATGC  
TCTTCGACGGGGCGACGCCGGTGGCGTACCGGTACGGTGTACATGATCATGAAAGCT  
GCACCAACTGGTGGACGAGATCCACCGCCGCTCCACGGGGCTACTCGATGATCACCCAGCG  
CTGGCGGTAAAGGCGCAGTTGGTGGCCAGGGTGGGGAGATGGAGTGCTGGGCCATGCAAGGCTACG  
GTGCTGCTACACCCCTGCAAGGAGCTGTTGACCTCAAGTCCGATGACACCGTGGCGCGTCAAGGTGTA  
CGAGGCAGTCGCAAGGGTGAGAACATCCCGAGGCCGATCCCGAGTGTGTTCAAGGTGCTCAA  
GAACGTGAGTCGCTGTGCTCAACGTCGAGGTGCTATCGAGTGAAGGTGCCGATCGAACTGCCGAAAG  
GTGAGGGAGGAGGACCTGGAGCGGGCGCCGAGGAACTGGGAATCAATCTGCCCCGCAACGAATCCGAAAG  
TGTGAGGGATCTGCGTAA

## Aislado 0202

### Gen rpoB

#### Mutación DS16F (GAC→TTC)

```
>fedora8202c_RpoB
TTGGCAGATCCCGCCAGAGCAAAACAGCCGTAGTCTTAGTCCAGTCGCCCAAAAGTCTCGAATA
ACTCCGTACCCGGAGGCCAAACCGGGTCTCTTCTGTAAGCTGCCGAACCACTTGAGGTTCCGGGACT
CCTTGACGTCCAGACCGATTCTGTTGAGTGGCTGATCGGTCGCCGCTGGCGGAATCCGCCGCCAG
CGGGGTGATCTAACCCAGTGGGTGGCTTGGAGAGGTGCTCTACGAGCTGTCCTCGATCGAGGACTTCT
CCGGGTCATGTCGTTGTCGTTCTGACCCCTGTTGACGATGTCAGGCACCGTCGACGAGTGCAA
AGACAAGGACATGACGTACCGGGCTCACTGTTGTCACGCCGAGTTCATCAAACAACACCGGTGAG
ATCAAGAGTCAGACGGTGTCTAGGGTGAECTTCCGATGATGACCGAGAAGGGCACGTTCATCATCAACG
GGACCGAGCGTGTGGTGGTCAGCCAGCTGGTGGTCGCCGGGGGTGACTTCGACGAGACCATGACAA
GTCCACCGACAAGACGCTGACAGCGTCAGGTGATCCGAGCCGCCGGCGTGGCTCGAGTTGACGTC
GACAAGCGCAGACCCGTCGGCGTGCATCGACCGCAAAACGCCGGAACCGGTGACCGTGTGTCAGG
CGCTGGGCTGGACCAGCGAGCAGATTGTCGAGCGGTTGGGTTCTCGAGATCATGCACTGACGCTGGA
GAAGGACAACACCGTCGGCACCGAGGGCGTGTGGACATCTACCGCAAGCTGCTCCGGCGAGCCC
CCGACCAAAAGTCAGCGCAGACGCTTGGAAAATTTCTCAAGGAGAACGCTACGACCTGGCC
GCGTCGGTCGCTATAAGGTCACAAGAAGCTCGGGCTGATGTCGGCGAGCCCATCACGTCGTCAGCCT
GACCGAAGAAAGACGTCGTCGGCCACCATGAAATATCTGGTCCGCTTGACGAGGGTCAGACCAACGATGACC
GTTCCGGCGGCGTGCAGGGTGGAAACCGACGACATCGACCACTTCCGAAACCGCCGGCTGCTGTA
CGCTGGCGGAGCTGATCCTTAAACAGATCCGGTGGGATGTCGCGGATGTCGAGGAGGGTGGTCCGGGAGCG
GATGACCAACCCAGGACGCTGGAGGGCATCACCCGAGCTGAGCCAATTCAATTGCAAGAACACCGT
ATCAAGGAGTTCTCGGACCCAGCTGAGGATCACCCGAGCTGAGCCAATTCAATTGCAAGAACACCGT
CCCACAAGGCCACTGTCGGCGTGGGCCCCGGCTGTCAGCTGAGCGTCCGGCTGGAGGTCCG
CGACGTGCAACCGTCGACTACGGCCGGATGTCGGGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTG
ATCGGCTCGCTGCGTGTACCGGGGTCACCCGTTGGGTCATCGAAACCCGTAACCGCAAGGTTGG
TCGACGGCGGGTTAGCGACGAGATCGTGTACCTGACCGCCGAGGGAGGACCGGCACTGTTGGCACA
GGCAATTCCGGGATCGATCGGGACGGTCTGTCGACCCGCGCGTGTGGTCCGGCAAGGCGGGC
GAGGTGGAGTAGTGGCCCTGCTGAGGTGGACTACATGGACGTCGCCCCGGCAAGATGGTGTGGTGG
CCACCGCGATGATCCCTTCTGGAGCACGACGACGCAACCGTGGCCCTCATGGGGCAAAACATGCAAGG
CCAGGGCGTGGCGTGGTGGCTAGCGAGGGCCCGTGGGACCGGGATGGAGCTGCGCGCGGCGATC
GACGCCGGCAGCTGTCGTCGCGAAGAAAGCGGCGTATCGAGGAGGTGTCGGCCGACTACATCACTG
TGATGACGACAAACGGCACCCGGTACTACCGGATGCGCAAGGTTGGCCGGCTGGTCAACCGGCACTTGG
CGCCAACCAAGTGGCCATCGTGGACGGCGGCGACGAGTCGAGGGCGGGCTAGGTGATCGCCGACGGTCCC
TGTACTGACGACGGCGAGATGGCGTGGGCAAGAACCTGCTGGTGGCCATCATCGTGGGAGGGCCACA
ACTACGAGGACGGCGATCATCGTGGGCAACCAAGCTGGGTGGGAGGAGTACCCCGACATCCGAAACATC
GGAGCATGAGATCGTCTCGCGACCAAGCTGGGTGGGAGGAGTACCCCGACATCCGAAACATC
TCGACGAGGATCTCGGCGACCTGGATGAGCGGGCATCGTGCACATCGTGGCCGAGGTTCGCGACGGGG
ACATCGTGGTGGCAAGGTCACCCCGAGGGTGGAGACGAGCTGACGCCGGAGGAGCGCTGTCGTGSC
CATCTCGGTGAGAAGGCCCGAGGTGCGGACACTTCGCTGAGGTGGCCGACGGCAATCCGCAAG
GTGATCGGCAAGATCTGGGTTGGGTCAGAAACGCAAGATCTCGACGGTGACAAGCTGGCCGGCCGACGGCAACAAAGG
CGTGTGGCAAGATCTGGGTTGGGTCAGGACATGCCGTTCTGCGGACGGCACCCGGTGGACATTATT
TTGAACACCCACGGCGTGGCGACGGATGAAACATCGGCAAGATTTGGAGACCCACCTGGGGTGGTGTG
CCCACAGGGCCTGGAGGTGACGCCGCAAGGGGTTCCGGACTGGGCGGCCAGGCTGCCGACGAACT
GCTCGAGGCAGCCGAACCGCATTGTCGACGCCGGTGGTGCACGGCGCCAGGAGGCCAGCTGAG
GGCGTGTGGTGTGCACTGCGGACGGCGACGGTGTGCTGGTGCAGGCCACGGCAAGGCCATGC
TCTCGACGGGCGCAGCGGGAGGCCGTTCCGGTACCGGGTGCACGGTGGGTCACATGACATCATGAAAGCT
GCACCAACCTGGTGGACGACAAGATCCACGCCGCTCCACGGGGCTACTCGATGATCACCCAGCAGCCG
CTGGGGCGTAAGGGCGAGTTGGTGGGAGCGGGTTGGGAGGAGTGGAGTGTGGGCGATGCCAGGCTACG
GTGCTGCTACACCCCTGCAAGGGACTGGTGGGACATCGTGCACGCCGAGGTGCTGAGGTTGAA
CGAGGCAGTGTCAAGGGTGGAGAACATCCGGAGGGCATCCCGAGTGTGTTCAAGGTGCTGCTCAA
GAACGTGAGTGTGCTGTCCTAACGTCGAGGTGCTATCGAGTGTGACGGTGCAGGCACTGACGCGAAG
GTGAGGGAGGAGACCTGGAGCGGGCGGGCAACCTGGGAATCAATCTGCCCCAACGAAATCCGCAAG
TGTGAGGGATCTTGGTAA
```

## Aislado 0208

### Gen rpoB

#### Mutación D516F (GAC→TTC)

>fedo\_a0208e\_RpoB  
TTGGCAGATCCGCCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCTAGTCCGAGTCGCCGCAAAGTCCCTCGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCCAAACCGGGCTCCTCGCTAAGCTGCCGAAACCATTGAGGTTCCGGGACT  
CCTTGACGTCCAGACCGATTGTTGAGTGGCTGATCGGTTGCCCGCTGGCGGAATCCGCCGCCGAG  
CGGGGTGATGTCACCCACTGGGTGGCTGGAAGGGTCTACAGCTGCTCCGATCGAGGACTTCT  
CCGGGTGATGTCGTTGCTCTGACCCCTGCTTCGACGATGTCAGGCACCCGTCAGCAGTGCAA  
AGACAAGGACATGACGTACCGGGCTCCACTGTTGTCACCGCCGAGTTCAACAACAACACCGGTGAG  
ATCAAGAGTCAGACGGTGTTCATGGGTGACTTCCCAGTATGACCGAGAAGGGCACGTTCATCATCAACG  
GGACCGAGCGTGTGGTGGTCAGCCAGCTGGCGCTGCCCGGGGTGACTTCGACGAGAACCTTGACAA  
GTCACCGACAAGACGCTGACAGCGTCAAGGTGATCCGAGCCGCGCTGGCTGAGTTGACGTC  
GACAAGCGGACACCGCTGGCGCATCGACCGCAACGCCGCAACCGGTACCGTCTGCTCAAGG  
CGTGGGCTGGACCAAGCGAGATTGTCAGCGGGTTCGGGTTCTCGAGATCATGCGATCGACGCTGGA  
GAAGGACACACCGTCGGCACCGACGAGGGCTGTGGACATCTACCGCAAGCTGCGTCCGGCGAGGCC  
CCGACCAAAGAGTCAGCGCAGACGCTGTTGAAAATTGTTCTCAAGGAGAAGCGTACGACCTGGCC  
GCGTCGGTCGCTATAAGGTCAACAAGAAGCTCGGGCTGCAATGTCGGCGAGCCATCACGTCGTCAGC  
GACCGAAGAAGACGTCGTCGGCACCATCGAATATCTGGTCCGCTTCACGAGGGTCAGACACGATGACC  
GTTCCGGCGCGTCAGGGTGGCGTGGAAAACCACGACGACATCGACCAACTTCCGCAACCGCCGCTGCTG  
CGGTCGGCGAGCTGATCCAAACAGATCCGGGTCGGCATGTCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCG  
GATGACCAACCCAGGACGCTGGAGGCATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCCG  
ATCAAGGAGTTCTCGGCACCAAGCCAGCTGAGCCAATTCACTTTCAGAACACCCGCTGTCGGGTTGA  
CCCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGCTGTCACGTGAGCGTGGCGGGCTGGAGGTCCG  
CGACGTGACCCGTGCACTACGGCGGATGTCGGGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTG  
ATCGGCTGCTGTCGGTGTACCGCGGGTCAACCCGTTGCGGTTCATCGAAACGCCGACCGCAAGGTGG  
TCGACGGCGTGGTTAGCGACGAGATCGTGTACCTGACCGCCGACGAGGGAGGCCACGTGGTGGCACA  
GGCCAATTGCGCGATCGATCGGACGGTCGTCGTCGCGAAGAAAGCGGGCTCATGAGGAGTGTGCGCCGACTACATCACTG  
TGATGACGACAACGGCACCCGCGTACCTACCGGATGCGCAAGTTGGCCGGTCAACCGGCACTTG  
CGCCAACCAAGTCCCCATCGTGGACGCGGGGAGCGGACTCGAGGCGGGTCAGGTGATCGCCGACGGTCCC  
TGTACTGACGACGGCAGATGGCGTGGGCAAGAACCTGCTGGTGGCCATCATGCCGTGGGAGGGCCACA  
ACTACGAGGACGGCATCTCTGTCACCGCTGGTCAAGGAGGACGCTCACCTCGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGATCGATGCTCGACACCAAGCTGGGTGGAGGAGATCACCGCGACATCCCGAACATC  
TCGGACGAGGTGCTCGCCGACCTGGATGAGCGGGGATCGTGGCGCATCGTGGTGGGAGGGTGGC  
ACATCTGGTCCGCAAGGTCAACCCGAAGGGTGAGACCGAGCTGACGGGGAGGAGCGGCTGCGTGC  
CATCTTCGGTGAGAAGGCCGCGAGGTGCGGACACTTCGCTGAAGGTGCCGACCGCGAATCCGGCAAG  
GTGATCGECATTGGGTGTTTCCCGAGGGACGAGGACGAGTTGCGGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC  
GTGTGATGTGGCTCAGAAACGCAAGATCTCGACGGTGAACAAGCTGGGCGGGGACGGCAACAAAGGG  
CGTGTGCGCAAGATCTGGCGTGGGCAAGGACATCGCGGCTCTTGGCGACGGCACCCGGTGGACATTATT  
TTGAACACCCACGGCGTGGCGACGGATGAAACATCGGCAAGATTTGGAGACCCACCTGGGTTGGTGTG  
CCCCACAGCGGCTGGAGGACGACCGCGCAAGGGGTTCCGGACTGGGCCGCCAGGAGGCCAGCTGCG  
GCTCGAGGCCAGCGAACGCCATTGTCGACGCCGTTGCGACGCCGCCAGGAGGCCAGCTGCG  
GGCCTGTTGCTGACGCTGCCAACCGCGACGGTGACGTGCTGGTGCAGGCCGACGGCAAGGCCATGC  
TCTTCGACGGCGCAGCGGCGAGCCGTTCCGTAACCGGTGACGGTGGCTACATGATCATCGAAGCT  
GCACCACTGGTGAGCAGAACATCCACGCCGCTCCACCGGGCGTACCTGATGATCACCCAGCGCG  
CTGGCGGTAAAGCGCAGTTGGTGGCAAGCGGTTGGGGAGATGGAGTGCTGGCCATGCAAGGCCAG  
GTGCTGCTACACCCCTGCAAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTCGGCGCGTCAAGGTGTA  
CGAGGCAGTCGTCAGGGTGAGAACATCCCGGAGGGCATCCCCGAGTCGTTCAAGGTGCTGCTCAAA  
GAACGTGAGTCGCTGTGCTCAACGTCGAGGTGCTATCGAGTGAACGGTGCAGCGATCGAAGCTGCGCAAG  
GTGAGGAGCAGGGACCTGGAGCGGGCGGGCAACCTGGGATCAATCTGCCCACGAACTCCGCAAG  
TGTGAGGATCTGGCTAA

## Aislado 0402

### Gen *rpoB*

### Mutación S531L (TCG→TTG)

>fedora8402\_RpoB  
TTGGCAGATCCCGGCCAGAGCAAAACAGCCCTAGTCCAGTCGCCCGCAAAGTTCCCTCGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCCAAACCGGGTCTCTTCGCTAAAGCTGCGCGAACCACTTGAGGTTCCGGACT  
CCTTGACGTCCAGACCGATTCTGTTGAGTGGCTGATCGGTTGCGCGCGTGGCGGAATCCGGCCCGAG  
CGGGGTGATGTCACCCAGTGGGTGGCTGGAAGAGGTGCTCTACGGAGCTGTCAGGATGTCAGGCACCGGCTG  
CCGGGTGATGTCGTTGTCGTTCTGACCCCTGTTGACGATGTCAGGCACCGGCTGACGAGTGCAA  
AGACAAGGACATGACGTACGGCTCCACTGTTGTCACCCGGAGTTCATCAACAACAACACCGGTGAG  
ATCAAGAGTCAGACGGTGTTCATGGGTGACTTCCCAGTGTGACCGAGAAGGGCACGGTTCATCATCAACG  
GGACCGACGCTGTTGGTGACTCCGGCTGCGGCCCCGGGTGACTTCGACGAGAACATTGACAA  
GTCACCCAGACAAGACGCTGACAGCGTCAAGGTGATCCCGAGCCGCGGCGTGGCTGAGTTTGACGTC  
GACAAGCGACACCGCTGCGCGCATCGACCCGAAACGCCGCAACCGGTGACCGTGTGCTCAAGG  
CGCTGGGCTGACCGAGCAGATTGTCGAGCGGTTCTCCGGAGATCATCGCAGTCACGGTGGCTG  
GAAGGACAACACCGCTGGGACCCGAGGCGCTGTTGGACATCTACCGCAAGCTGCGTCCGGCGAGCC  
CCGACCCAAGAGTCAGCGCAGAGCTGTTGGAAAACTTGTCTTCAGGAGAAGCGCTACGACCTGGCC  
GCGTCGGTGCCTATAAGGTCACAAGAAGCTGGGCTGCATGTCGGCGAGCCATCACGTCGTGAGGCT  
GACCGAACGAGCTGCGCCACCATCGAAATATCTGGTCCGCTGACGGAGGGTCAAGAACACGATGAC  
GTTCGGGCGCGCTGCGAGGTGCGGGTGAAACCGACGACATCGACCAACTTGGCAACCGCCCTGCTA  
CGGTCGGCGAGCTGATCCAAAACAGATCCGGGCTGGATGTCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCG  
GATGACCAACCCAGGAGCTGGAGGGGAGTCACACCGCAAGACGTTGATCAACATCCGGCGGTTGTCGCC  
ATCAAGGAGTTCTGGACCCAGGCACTGAGCCAAATTGACGGACAGAACAAACCCGCTGTCGGGTTGA  
CCCACAAGCGCGACTTGTGCGTGGGCGCCGGCTGTCAGCTGAGCGTGGCCGGCTGGAGGTCCG  
CGACGTCACCCGCTGCACTACGGCGGATGTCGGGATGTCGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTG  
ATCGGCTCGTGTGGTGTACGCGCGGGTCAACCGGTTGGGTTATCGAAACGCCGTACCGCAAGGTTG  
TCGACGGCGTGGTTAGCGACGAGATGTTGACCTGACCGCCACGAGGAGGAGCCACGTCGGTGGCACA  
GGCCAATTGCGGATGATGCGGACGGTCGTTCTGCAACGGCGGTCTGGTCCGCCGCAAGCGGGC  
GAGGTGGAGTAGTGTGCCCCCTGCTGAGGTGGACTACATGGACGTCGCCCCCTCATGGGGGCAAAACATCGAGCG  
CCAGCGGTGCCGTGGTCCGTAGCGAGGCCCGCTGGTGGGACCGGGATGGAGCTGCGCGGCGATC  
GACGCCGGCGACGTCGTCGCGAAGAAAGCGCGTACCTACCGGATGCGCAAGTTGCCCCTGCAACCCACGGACTTG  
TGTACTGACGACGGCAGATGGCGCTGGGCAAGAACCTGCTGGTGGGATCATGCGTGGGAGGGCCACA  
ACTACGAGGACGCGATCATCTGTCACCGCTGGTCAAGGAGGAGCTGACCGGAGGAGCTGCGGAGG  
GGAGCATGAGATGATGCTCGCGACCAACCGCAAGCTGGTGGGAGGAGATCACCGCGACATCCGAAACATC  
TCCGACGAGGTGCTGCCGACCTGGATGAGCGGGGATCGCGCATCGGTGCCAGGGTTCGCGACGGGG  
ACATCTGGTGGCAAGTCAACCGGAGGGTGAAGACCGGAGCTGACGCCGGAGGGAGCGGGTGTGCGTGC  
CATCTCGGTGAGAAGGCCCGAGGGTGCACGACACTTGGCTGAGGTGCGCACGGGAATCCGCAAG  
GTGATCGGCATTGGGTGTTTCCCGAGGGACGAGGACGAGGAGTTGCGGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC  
GTGTTGATGGCTCAGAACGCAAGATCTCGACGGTGAAGCTGGCCGGCGACGGCAACAAAGG  
CGTGATCGGCAGAGATCTGCCGGTGGAGGACATGCGCTTGGCGACGGGACCCGGTGGGACATTATT  
TTGAACACCCACGGCGCCGGAGGATGAAACATCGGCCAGATTGGAGGACCCACCTGGGTTGGGTG  
CCACAGCGGTGGAGGTGACGCCGCAAGGGGTTCCGGACTGGGGCCAGGCTGCCGACGAAACT  
GCTCGAGGCGCAGCGAACGCCATTGTCGACGCCGGTGGTGCACGCCGACGGCAAGGGCATGC  
GGCCTGTTGCTGTCACGCTGCCAACCGCAACGGTGCACGTCGACGCCGACGGCAAGGGCATGC  
TCTCGACGGCGCAGCGCGAGCGTCCCGTACCGGTCAAGGGTGGCTACATGACATCATGAAAGCT  
GCACCCACCTGGTGGACGACAAGATCCACGCCGCTCCACCGGGGAGTACTCGATGATCACCGACGCC  
CTGGGCGGTAGGGCGCAAGTCCGGTGGCCAGCGGGTTGGGGAGATGGAGTGTGGGGCATGCAGGCC  
GTGCTGCCTACACCCCTGCAAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTGCAGGCCGTCAGGTGTA  
CGAGGGCGATGTCAGGGTGGAGAACATCCGGAGGCGGGCATCCCGAGTGTGTCAGGTGCTGCTCAAA  
GAACCTGCACTGGCTGCCCCCTCAACGTCAGGGTGTATCGAGTGAAGGTGCGGGGATGAAACTGCC  
GTGAGGGACGAGGACCTGGAGGGGGCCGGGCAACCTGGGAAATCAATCTGTCGGCAACGAATCCGCAAG  
TGTGAGGGATCTGCGTAA

## Aislado 0409

### Gen rpoB

#### Mutación SS31L (TCG→TTG)

>fedo\_a0409\_RpoB  
TTGGCAGATCCCGCCAGAGCAAAACAGCCCTAGTCCTAGTCCGAGTCGCCCECAAAGTTCTCGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCAAACCGGGTCTCTTGCTAAGCTGCAGAACCACTTGAGGTTGCGGGACT  
CCTT6ACGTCCAGACC6ATTCTGTTGAGTGGCTGATCGGTTGCCGCGCTGGCGGAATCCGGCGCGAG  
CGGGGTGATGTCAGGCAACCGGGTCTGGCTGAGAGGTGCTCTACGAGCTGCTCCGATCGAGGAACTTCT  
CCGGGTGCGATGTCGTTGCTCTGACCCCTGCGACGATGTCAGGCAACCGGTGACGAGTGCAGA  
AGACAAGGACATGACGGCTCAGCTGAGGAGGTGCTCATCAACAACAACACCGGTGAG  
ATCAAGAGTCAGACGGTGTCTGGGTGACTTCCCAGTGTGACGGAGAGGGCACGTTGATCATCATCAACG  
GGACCGAGCGTGTGGTGGTCAAGCCAGCTGGTGGCTGCCGGGGTGTACTTCGACGAGGACATTGACAA  
GTCCACCGACAAGACGCTGACAGCTCAAGGATGATCCCAGGCCGGCGTGGCTGAGTTGACGTC  
GACAAGCGCGACACCGTGGCGCATGACCGCAAACCGCGCAACCGGTGACGGTGTGCTCAAGG  
CGCTGGGCTGACCGAGCAGGAGGAGATTGTCAGCGGTTGCGGGTCTCCGAGATCATGCGATGACGCTGGA  
GAAAGAACACCGTGGCACCGAGGAGGAGCTGGTGGACATCTACCGCAAGCTGCTCCGGGGAGGCC  
CCGACCAAAGAGTCAGCGAGACGCTGGTGGAAAAGTGTCTTCAAGGAGAACGCTACGACCTGGCC  
CGCTGGTGTATAAGGTCAACAAGACGCTGGGCTGCAATGTCGGTGGTGTGACGAGGGTCAAGGACGCT  
GACCGAAGAAGACGTCGTCGGCACCATGCAATATCTGGTCCGTTGACGAGGGTCAAGGACGATGAC  
GTTCCGGGCGGCTGAGGTGCCGGTGGAAACCGACGACATGACCAACTTCGGCAACCGCCCTGCGTA  
CGGTGGCGAGCTGATCAAACAGATCCGGTGGCATGTCGGGATGGAGCGGGGGTGTGGGAGCG  
GATGACCAACCCAGGAGCTGGAGGCGATCACACCGAGCTGGTGTGATCAACATCCGGCGGTGGTGGCG  
ATCAAGGAGTTCTCGGACCAAGCAGCTGAGCCAATTGACGAGAACACAACCCGCTGTCGGGGTTGA  
CCCCAACGGCCGACT TTG .CGCTGGGCCCCGGGTCTGTCAGTGGCTGCCCCGGTGGAGGTCC  
CGACGTCACCGTCGCACTACGGCGGATGTCGCCGATGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTG  
ATCGGCTCGTGTGGTGTACGGCGGGTCAACCGTTGGGTTATCGAAACGCGTACCGCAAGGTGG  
TCGACGGCGTGGTTAGCGACGAGATGCTGTTACTGACCGGGACGAGGGAGGCCACGGTGGTGGCACA  
GGCCAATTCCGCGATGATGCCGAGCTGGTGGTGTGAGCCGGCGTGGTGGGACGGTGGCGCG  
GAGGTGGAGTAGTGTGCCCTGCTGAGGTGGACTACATGGACGCTCTGCCCGGAGATGGTGTGGTGG  
CCACCGCGATGATTTCCCTTCTGGAGCACGACGACGCCAACCGTGGCTCATGGGGCAAAATGCAAGCG  
CCAGCGGTGCGCTGGTGTAGCGAGGCCGGTGGTGGGACCGGGGGATGGAGCTGGCGCGCG  
GACGCCGGCGACGCTGTCGTCGCCGAGAACAGCGGCGTCACTGAGGGAGGTGTGCGCCGACTACATCA  
TGATGACGACAACGGCACCCGGTACCTACCGGATGCCAAGTTGCCGGTCAACCCACGGCACTTG  
CGCCAACCAAGTGGCCATCGTGGACGCCGGGACCGGAGTCAGGGCCGGTCAAGGTGATGCCGACGGTCCC  
TGTACTGACGACGGCGAGATGGCCTGGGCAAGAACCTGCTGGTGGGATCATGCCGTGGGAGGGCACA  
ACTACGAGGAGCGGATCATCTGTCACCCGCTGGTCAAGAGGGACGCTGCTCACCTGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGATGATGCTGCCGACACCAAGCTGGTGGAGGAGATACCCGCAACATCCCACATC  
TCCGACGAGGTGCTGCCGACCTGGATGACGGGGCATCGTGCACGCTGGTGGGAGGTGCGACGGGG  
ACATCTGTCGCGCAAGGTACCCGAGGGGGTGGAGGACGACTGACGCCGGAGGGGCTGCTGCG  
CATCTCGGTGAGAAGGCCCGAGGTGCCGACACTTCGCTGAGGTGCCGACGGCAATCCGCAAG  
GTGATCGGCATTGGGTGTTCCCGCGAGGACGAGGAGCTGGTGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC  
GTGTGTATGTGGCTCAGAAACGCAAGATCTCGGAGGTGACAAGCTGGGGGGGCGACGGCAACAGGG  
CGTATCGGCAGAATCTGCCGGTTGAGGACATECCGTTCTTCCGACGGGACCCGGGGGATATT  
TTGAAACCCCACGGCGTGGCGCGACGGATGAAACATCGGCAGATTTGGAGACCCACCTGGGGTGGTGT  
CCACAGGGGGTGGAAAGCTGACGCCAACGGGGTTCCGAGCTGGGGGGGAGGGGGACTGCGAG  
GCTCGAGGGCGCACGCCATTGTCGACGCCGGTGGAGCTGGTGGCGACGCCGAGGGCAACGGCATGC  
GGCGTGGTGTGTCGACGCTGCCCAACCGGAGCGGAGCTGGTGGCGACGCCGAGGGCAACGGCATGC  
TCTCGACGGGGCGAGCGGAGCGGTTCCGTCACCGGTGACGGTGGCTACATGATCATGAAAGCT  
GCAACACCTGGTGGACGACAAGATCCACGCCGCTCACCGGGCGTACTCGATGATCACCCAGCG  
CTGGGGCGGTAAGGCGCAGTTCGGTGGCCAGCGGTTGGGGAGATGGAGTGTGGGGCATGCAAGGCTACG  
GTGCTGGCTACACCTGCAAGGGAGCTGGTGGACATCAAGTCCGATGACACCGTGCAGGGCGTCAAGGTGA  
CGAGGGCGATCGTCAGGGTGGAGAACATCCGGAGGGCGATCCCGAGTGTGTTCAAGGTGCTGCTCAA  
GAACTGCACTGCTGTGCGCTCACGTCGAGGTGCTATCGAGTGAAGGTGCGGAGTCAACTGCGCAAG  
GTGAGGGACGAGGACCTGGAGGGCCCGGGCAACCTGGGAATCAATCTGCCCAGAATCCGCAAG  
TGTGAGGGATCTGCGTAA

## Aislado 0605

### Gen *rpoB*

### Mutación H526D (CAC→GAC)

>fedora0605\_RpoB  
TTGGCAGATTCCGCCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCCTAGTCGAGTCGCCGCCAAAGTCCTCGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCAAACCGGGCTCTCTCGTAAGCTGCAGAACCACTTGAGGTTCCGGGACT  
CTTGAATGTCAGACCGATTCTGTCAGTGGCTGATCGGTTGCCGCCGCTGGCGGAATCCGCCGCCAG  
CGGGGTGATGTCACCCAGTGGGTGGCTGGAAAGAGGTGCTACGAGCTGTCCTCGATGCAAGGCAACCGTGAA  
CGGGTCTGTCGTTCTGACCCCTGCTGACGATGTCAGGCAACCGTGACGAGACTTCT  
AGACAAGGACATGACGTAACGGCTCCACTGTTGTCACCCCGAGTTCATCAACAACACCCGGTGAG  
ATCAAGAGTCAGACGGTGTTCATGGGTACTTCCCAGTGAACCGAGAAAGGGCACGTTCATCATCAACG  
GGACCGACGGTGTGGTGGTCAAGCAGTGGTCGGTGCAGGGGGGTGACTTCGACGAGACATTGACAA  
GTCACCGACAAGACGCTGACAGCGTCAAGGTGATCCCAGCCGCCGGCTGAGGTTGACGTC  
GACAAGCGGACACCGTCGGCTGTCATGACCCGGCAAAACCGGCAACCGGTCACCGTCTGTCAGG  
CGCTGGGCTGGACCCAGCGAGCAGATTGTCAGGCGTTCTGGGAGATCATGCGATCGACGCTGG  
GAAGGACAACCTGCGGACCGAGGCGCTGTTGGACATCTACCGCAAGCTGCGTCCGGGAGGCC  
CCGACCAAGAGTCAGCGCAGACGCTGTTGGAAAACCTGTTCTCAAGGAGAAGCGTACGACCTGGCC  
GCTGCGTCTGCTATAAGGTCACAAAGACCTGGGCTGCAATGTCGGAGGCCATCACGCTGTCACGCT  
GACCGAAGAAGACGTCGTGGCCACCATCGAATATCTGGTCCGTTGCAAGGAGGTGAGACACGATGACC  
GTTCCGGGCGCGTCGAGGTGCGGTTGGAAACCGACGACATGACCACTTCGGCAACCGGCCCTGCGTA  
CGCTGGCGAGCTGTCACAAACAGATCGGGCTGGCAGTGCAGGAGGTGAGCGGGTGGTCCGGGAGG  
GATEACCAACCCAGGAGCTGGAGGGCATCACACCGAGACGTTGATCAACATCCGGCGGTGGTCCGGCG  
ATTAAGGAGTTCTCGGACACGGCAGCTGAGGCAATTTCATGGACCAAGAACACCCGTTGGGGGTTGA  
C GAC VAGCGCCGACTGTGCGGCTGGGGCCGGCGTGTCACTGAGGCGTGCAGGGGGTGGAGGTCCG  
CGACGTGACCCCTGCGACTACGGCGGATGTGCGGATGCAAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTG  
ATCGGCTCCTGTCGGTGTACCGCGGGTCAACCGTTCGGTTCATGAAACCGGTAACCGCAAGGTG  
TCGACGGCTGGTTAGCGACGAGATCGTGTACCTGACGCCGAGGGAGGCCACGGTGGTGGCACA  
GCCAATTCGCGCATGCGATGCCGCTGGCTTCGTCGAGGCCGCGTGTGGTCCGCCAACGGCGGG  
GAGGTGGAGTACCTGCCCCCTGTCGGTGTACATGGAGCTCTGCCCCGCAAGATGGTGTGGTGG  
CCACCGCGATGATTCCTTCTGGAGCACGACGACGCCAACCGTGCCTCATGGGGCAAACATGCAACG  
CCAGGCCTGCGCTGGTCCGAGCGAGGCCCCCTGGTGGCACCGGGATGGAGCTGCGCGGGCGATC  
GACGCCGGCGACGTCGTCGTCGCGGAAGAANGCGCGTATCGAGGAGGTGCGGGCAACTACATCACTG  
TGATGACGACAACCGCACCCCGTACCTACCGGATGCGCAAACTTGGCCGGTCAACACGGCACTTG  
CCGCAACCAAGTGGCCATCGTGGACGCCGGGACCGAGTCAGGCGGGTCAAGGTGATGCCGACGGTCCC  
TGTACTGACGACGGCAGATGGCGTGGGCAAGAACCTGCTGGTGGCATCATGCCGTGGGGGCAACA  
ACTACGAGGACGCGATCATCTGTCACCCGGCTGGTCAAGAGGGAGCTGCTCACCTCGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGATCGATGCTCGCGACACCAAGCTGGGTGCGAGGAGGATCACCCGCGACATCCGAACATC  
TCCGACGAGGTGCTGCCGACCTGGATGAGCGGGGATCGTGGCCGAGGTTGCGGACGGGGTGTGGTGC  
ACATCTGGTGGCAAGGTACCCCGAAGGGTGAGACCGGAGCTGACGCCGAGGGGGTGTGGTGC  
CATCTGGTGGGATGAGAAGGCCGCGAGGTGCGCACACTTCCTGCAAGGTTGCGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC  
GTGATCGGCATTCGGTGTGTCAGAAACGCAAGATCTCCGACGGTGTACAGCTGGCCGGCGCAAGG  
CGTGTGATGAGGACATCTGCGGTTGAGGACATGCCGTTCTGCCGACGCCAACCCGGTGGACATTATT  
TTGAACACCAACGGCTGCCGACGGATGACATGCCGAGATTTGGAGGCCACCTGGGTTGGTGTG  
CCACAGCGCTGGAGGTGACGCCGCCAACGGGGTTCCGAGCTGGGCCGCCAGGCTGCCGACGAACT  
GCTCGAGGCGCACCCGAACGCCATTGTCGACGCCGGTGTGACGCCGCCAGGAGGCCGAGCTGCA  
GCCCTGTTGCGTGCACGCTGCCAACCGCACGGTGTGACGCCGACGCCAACGGCATGC  
TCTCGACGGGCCAGCGGCCGAGGCCGTCCCGTACCGGGTGTGACATGACATCATGAAAGCT  
GCACCACTGGGGACGACAAGATCCACGCCGCTCCACCGGGCTACATGATGACACCCAGGCG  
CTGGGCGGTAAGGCGAGTTGGTGGCAGCGGTTCCGGGGAGATGGAGTGTGGGCGATGCCAGGCTAC  
GTGCGGCCATACACCCCTGCAAGGAGCTGTTGACATCAAGTCCGATGACACCGTGGCCGCGTCAAGGTGTA  
CGAGGGCGATCTCAAGGGTGAGAACATCCCGAGCCGGCATCCCGAATGTCGTTCAAGGTGCTGCTCAA  
GAAGTGCAGTCGCTGTCCTCAACGTCAGGAGTGTATCGAGTGCACGGTGCAGGCGATGAAATGCGCGAAG  
GTGAGGAGCAGGAGACCTGGAGCGGGCGCGCAACCTGGGAATCAATCTGTCGGCAACGAATCCGCAAG  
TGTGAGGAGATCTTECGTAA

**Aislado 0708**  
**Gen *rpoB***  
**Mutación H526D (CAC→GAC)**

>fedora8788c\_RpoB  
TTGGCAGATCCCGCAGAGCAAAACAGCCCTAGTCCTAGTCGGAGTCGCCGCAGAAGTTCCCTGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCCAACCGGGTCTCTTCGTAAGCTGCGCAGAACCTTGAGGTTCCGGGACT  
CTTGACGTCAGCAGGATTCTCGAAGTGGCTGATCGGTTGCCGCCTGGCGGAATCCGCCGCCGAG  
CGGGGTGATGTCAACCCAGTGGGTGGCTGGAAAGAGGTGCTTACGAGCTGCTCCGATCGAGGACTTCT  
CCGGGTGATGTCTGTTCTGACCCCTGTTGACGATGTCAAGGACCCCGTCAACGAGTGCAGAAGTCAA  
AGACAAGGACATGACGTACGCCCTCCACTGTTGTCACCGCCAGTTCATCAACAACACCGGTGAG  
ATCAAGAGTCAGACGGTGTCTGGGTGACTTCCGATGATGACCGAGAAGGGCACGTTCATCATCAACG  
GGACCGAGCGTGTGGTGTAGCCAGCTGGTGCCTGCCGGGTGTAATTGACGAGAACCTTGACAA  
GTCCACCGACAAGACGCTGACAGCGTCAAGGTGATCCCAGCGCCGGCTGAGTTGACGTC  
GACAAGCGGACACCGTGGCGTGCATCGACCGCAACCGCCGGCAACCGTCACCGTGTCTCAAGG  
CGCTGGGTGGACCGAGCGAGGATTTGCGAGGCGGTTCCGAGAATCATCGGATCGACGCTGGA  
GAAGGACAAACACCGTGGCGACCGAGGGCGTGTGGACATCTACCGAAGCTGCGTCCGGCGAGCC  
CCGACCAAAAGACTCGCGAGACGGCTGTTGAAAACCTGGTCTCAAGGAGAAGCGCTACGACCTGGCC  
GCGTGGTGTGCAAAAGTCAGAAGCTGGGCTGCACTGCGGAGCCCCATCACGTCGACGCT  
GACCGAAAGAAGACGTCGTGGCACCCATGAAATCTGGTCCACGGGTGACGACCAACGATGACC  
GTTCCGGCGGGCGTGGAGGTGGCGTGGAAACCGACGACATCGACCACTCGCAACCGCCCTGCGTA  
CGGTGGCGAGCTGATCCAAAACAGATCGGGCTGCGATGTCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGAGCG  
GATGACCAACCGAGGCTGGAGGCATCACCCGCAAGACGTTGATCAACATCCGGCGGTGGTCCGGCG  
ATCAAGGAGTTCTGGCACGCCAGCTGAGGCAATTGACGACAGAACACCCGCTETCGGGGTTGA  
C1 GAC IACGCGGCACTGTCGGCGTGGGGCCGGCGGTCTGTCAGTGCAGCGTGGGGCTGGAGGTCCG  
CGACGTGACCCGTCGACTACGGCGGATGCCCCATGAAACCCCTGAGGGGCCAAACATCGGTCTG  
ATCGGCTGCTGCGGTGACCGCGGGTCAACCGTTGCGGTTCATGAAACGCGTACCGCAAGGTTG  
TCGACGGCTGGTTACCGACGAGATCGTGTACCTGACCGCGGACGGAGGAGAACGCCACGTTGGTGGACA  
GGCCAATTGCGGATCGATGCCAGGTCGCTTCTGCGAGCCGGCTGCTGGTCCGGCAAGCGGGC  
GAGGTGGAGTACGTGCCCTGCTGAGGTGGACTACATGGACGTCGCCCCGCCAGATGGTGTGG  
CCACCGCGATGATCCCCCTGAGCACGACGCCAACCGTGCCCTCATGGGGGAAACATCGAGCG  
CCAGCGGTGCGCTGCTGGTAGCGAGGCCGCTGGTGGGACCGGGATGGAGCTGCGCGCCGATC  
GAGCGCCGAGCTGCTGCGAGAACAGCGGCCGATCCACCGGATGCGCAAGTGGCCGACACTAC  
TGATGACGACAACGGCACCCGGCTACCTACCGGATGCGCAAGTTGGCCGTCACACCGGACTTG  
CCCAACCAAGTGGCCCATCGTGGACGCGGGGACCGAGTCGAGGCCGTCAGGTGATGCCGACGGTCCC  
TGTACTGACGACGGCAGAGATGGCGTGGCAAGAACCTGCTGGTGGCCATCATGCCGTGGAGGGCCACA  
ACTACGAGGACGGGATCATCTGTCACCGCTGGCGAAGAGGGACGTCGTCACCTGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGATCGATGCTCGGACACCAAGCTGGTGTGGAGGAGATCACCCGCGACATCCCGAACATC  
TCCGACGAGGTGCTGCCGACCTGGATGAGCGGGGATCGTGCATGTCGCGAGGTTGCCGACGGGG  
ACATCCCTGGTGGCAAGGTACCCCGAAGGGTGAGACCGAGCTGACGCCGGAGGAGCGGCTGCTGCG  
CATCTTGGTGAAGAGGCCGAGGTGCGGACACTTCGCTGAAAGGTECCGACGGCAATCCGGCAAG  
GTGATCGGCATTGCGGTGTTTCCCGCGAGGACGAGGACGAGTGGCGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC  
GTGTGTATGGGTCAAGAACCGAAGATCTCGAGGGTGAACAGCTGGCGGGCAGGGCAACAAAGGG  
CGTGTGGCAAGATCTGGCGTTGAGGACATGCGGTTCTGGCGAGGGCACCCGGTGGACATTATT  
TTGAAACACCCACCGGGCGAGGGTGAACATCGCCGAGATTTGGGAGACCCACTGGTTGGTGTG  
CCCACGCGGCTGGAAAGGTGAGCGCCCAAGGGGGTCCGGACTGGGCGCCAGGCTGCCGAGAACT  
GCTCGAGGGCAGCGAACGCCATTGTCGACGCCGGTGGTGCAGGCCGCCAGGGAGGGCAGCTGCG  
GGCTGTTGTCGACGCTGCCCAACCGGACGGTACGTCGCTGGTGCAGGCCGACGGCAAGGCCATGC  
TCTCGACGGGCGAGCGGGGAGCCGTTCCGTAACCGGTCACGGTTGGCATATGATCATGAGCT  
GCACCACTGGTGGACGACAAGATCCACGCCGCTCCACCGGGCGTACTCGATGATCACCCAGCAACCG  
CTGGCGGTAAAGCGCAGTTGGCGAGGGTTCGGGGAGTGGAGTGCCTGGGCCATGCAGGCCATGC  
GTGCTGCCTACACCCCTGAGGGACTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTCGGCGCTCAAGGTGTA  
CGAGGGGATCGTCAGGGGTGAGAACATCCCGAGGCCGATCCCCGAGTCGTTCAAGGTGCTCAA  
GAACCTGAGTCTGCTGCTCAACGTCAGGGTGTATCGAGTGACGGTGCAGGCGATCGAATGCCGGAAG  
GTGAGGGACGAGGAGACTGGAGCGGGCCGCGCCAAACCTGGGAATCAATCTGCTGCCAAGGAATCCGCAAG  
TGTGAGGGATCTGGTAA

Aislado 0801  
Gen rpoB  
Mutación Wild type

>fedora8801c\_RpoB  
TTGGCAGATTCCGCCAGAGCAAAACAGCGCTAGTCCTAGTCCGAGTCGCCGCAAAGTCCCTCGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCAAACCGGGTCTCCCTCGTAAGCTGCAGCGAACCACTTGAGGTTCCGGGACT  
CCTTGACGTCCAGACCGATTCTGTTGAGTGGCTGATGGTTGCCCGCTGGCGGAATCCGCCGCGAAG  
CGGGGTGATGTCACCCAGTGGGTGGCTGGAAGAGGTGCTCTACGAGCTGTCCTCGATCGAGGACTTCT  
CCGGGTGATGTCGTTGTCCTCTGATCCCTGTTGACGATGTCAGGCAACCGTCAGCGAGTGAA  
AGACAANGACATGACGTACGCCGCTCCACTGTTGTCACCGCCGAGTTCATCAACAACAACACCGGTGAG  
ATCAAGAGTCAGACGGTGTTCATGGGTACTTCCGATGATGACCGAGAAGGGCAAGTTATCATCAACG  
GGACCGAGCGTGTGGTGGTCAGCCAGCTGGTGGCTGCCCGGGGTGACTTCGACGAGACCATGACAA  
GTCCACCGACAAGACGCTGACAGCGTCAGGTGATCCGAGCCGCCGCGTGGCTGAGTTGACGTC  
GACAAGCGCACCCGTCGGCGTGCATCGACCGCAAAACGCCGCAACCGGTACCGTGTGTCAGG  
CGCTGGGCTGGACCAAGCAGATTGTCAGCGGTTCCGGGTTCTCCGAGATCATGCGATCGACGCTGGA  
GAAGGACAACACCGTCGGCACCGACGAGGCGTGTGGACATCTACCGCAAGCTGCGTCCGGGAGGCC  
CCGACCAAGAGTCAGCGCAAGCGTGTGGAAAACCTGTTCTCAAGGAGAAGCGTACGACCTGGCC  
GCGTGGTCGCTATAAGGTCACAAGAAGCTGGGCTGATGTCGGCGAGCCATCAEGTGTGACGCT  
GACCGAAAGACGTCGTGCCACCATGAAATATCTGGTCCGTTGACGAGGGTCAAGACACGATGACC  
GTTCCGGGCGGCGTCAGGTGCGGTGAAACCGACGACATCGACCAACTCGCGCAACCGCCCTGCGTA  
CGGTGGCGAGCTGATCCTACCGGCGTGTGGACATCGCGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCG  
GATGACCAACCCAGGACGTCGAGGCGATCACACCGCAAGACGTTATCAACATCCGGCCGGTGGTCCGCG  
ATCAAGGAGTTCTCGGACCCAGCAGCTGAGCCAATTCAATGACAGAACACCCGCTGCGGGTTGA  
C(CAC)AACGCGCACTCTCGCGCTGGGCCCCGGCTGTLALGTGAGCGTGCCTGGGCTGGAGGTCCG  
CGACGTCGACCCCGTCGACTACGGCCGATGTCGCCCATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTG  
ATCGGCTGCTGTCGGTGTACGCGCGGTCAACCGTTGGGTCATCGAAACGCGTACCGCAAGGTGG  
TCGACGGCGTGGTAGCAGCAGATGTCACCTGACCGCCGACGAGGAGGACGCCACGTGGTGGCACA  
GCCAATTGCGGATCGATGCGGACGGTCGCTTGTCGAGCGCGCTGCTGGTCCGCCAAGGGGGCG  
GAGGTGGAGTAGCTGCCCCCTGTCGAGGTGGACTACATGGACGTCGCTCGCCCCCAGATGGTGTGG  
CCACCGCGATGATTCCCTCTGGAGCACGACGACCCGCAACCGTGCCCTCATGGGGCAAACATGCA  
CCAGCGGTGCCGTGGTCGAGGCCCCGCTGGTGGGACCGGGATGGAGCTGCCGCCGCGATC  
GACGCGCGACGTCGTCGCGAAGAAAGCGGCTCATCGAGGAGGTGTCGGCCACTACATCACTG  
TGATGACGACAACGGCACCCGGCTACCTACCGGATGCGCAAGTTGCCCCTGAAACCCACGGCACTTG  
CGCCAACCAAGTCCCCATGTCGGACGCGGGCGACCGAGTCGAGGGCGGTCAAGGTGATGCCGACGGTCC  
TGTACTGACGACGGCGAGATGGCGCTGGCAAGAACCTGCTGGTGGCATCATGCCGTGGGAGGGCCACA  
ACTACGAGGACGCGATCATCTGTCACCGCTGGTCGAAGAGGACGTCACCTCGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGATGATGTCGCGACACCAAGCTGGGTGCGGAGGAGATACCCCGCAATCCGAAACATC  
TCCGACGAGGTGTCGCGCACCTGGATGAGCGGGGATCGTCGCGCATCGGTGCCGAGGTTGCGACGGGG  
ACATCTGGTCCGCAAGGTACCCCGAAGGGTGAAGACCGAGCTGACGCCGGAGGAGCGGTGCTGCGTGC  
CATCTGGTGAAGGCCCGCGAGGTGCGGACACCTTCGCTGAAGGTGCGCAGCGGAATCCGGCAAG  
GTGATCGGATTCGGGTGTTTCCCGCAGGACGAGGAGGATGGGCTGCGGGCGGTGCAAGGAGCTGGTGC  
GTGTTATGTTGCTGAGAACGCAAGATCTCCGACGGTGAAGGTGGGCGGACCGCAACAAGGG  
CGTGATCGGCAAGATCTGCCGGTGAAGGACATGCCCTTGGCAGCGCACCCGGTGGACATTATT  
TTGAACACCCACGGCGTGCAGCGACGGATGAAACATCGGCCAGATTGGAGACCCACCTGGGTTGGTGTG  
CCCACAGCGCTGGAGGTGCAACGCCGCAAGGGGTTCCGACTGGGCGCAGGCTGCCGACGA  
GCTCGAGGCAGCCGACCGCATTGTCGAGCGGGTGTGCAACGGCGCCAGGAGGCCAGCTGCA  
GGCGTGTGTCGACGCTGCCAACCGCGACGGTGACGTGCTGGTCACGCCGACGGCAAGGCCATGC  
TCTCGACGGCGACCGCGAGCGTCCACGGGCTCACGGTTGGCTACATGATCATCATGAAGCT  
GCACCACTGGTGGACGACAAGATCCACGCCGCTCCACCGGGCGTACTCGATGATCACCCAGCG  
CTGGGCGTAAGGGCGAGTTGGTGGCAGCGGTTGGGAGATGGAGTGCTGGGCGATGCAAGGCTACG  
GTGCTGCTACACCCCTGCAAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTCGGCCGCTAAGGTGTA  
CGAGGGGATGTCAGGGTGAGAACATCCGGAGCCGGCATCCCGAGTCGTTCAAGGTGCTGCTCAAA  
GAACGTGAGTCGCTGTCGCTCAACGTCAGGTGCTATCGAGTGACGGTGCGGCGATGAACTGCCGAA  
GTGAGGAGCAGGACCTGGAGCGGGCCGCGCAACCTGGGAATCAATCTGTCGGCAACGAAATCCGCAAG  
TGTGAGGATCTTGCCTAA

Aislado 1005  
Gen *rpoB*  
Mutación H526Y (CAC→TAC)

>fedora1005\_RpoB  
TTGGCAGATTCCGCCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCCTAGTCCGAGTCGCCGCAAAGTTCCCTGAATA  
ACTCCGTACCCCCAGGCGCAAACCGGGTCTCCCTCGCTAACGTCGCGAACCACCTTGAGGTTCCGGGACT  
CCTTGACGCCAGACCGGATTCTCGAGTGGCTGATCGGTCGCCGCTGGCGGAATCCGCCGGAG  
CGGGGTGATGTCACCCAGTGGTGGCTGGAGAGGTCTCTACGACGTGTCAGGCAACCGCTGACGAGTGCCT  
CCGGGTGATGTCGTTGCGCTCTGACCCCTGTTGACGATGTCAGGCAACCGCTGACGAGTGCCT  
AGACAAGGACATGACGTACGCCGCTCCACTGTCGTCACCGCGAGGTTCATCAACAACAACACCAGGAG  
ATCAAGAGTCAGGGTGTTCGGGTGACTTCCCAGTACGACCGAGAAGGGCACGTTCATCATCAACG  
GGACCCAGCGTGTGGTCAACCCAGTGGTGGGTGCGCCGGGGGTGACTTCGACGAGACCATGGACAA  
GTCACCCAGACAAGACGCTGCAACAGCGTCAAGGTGATCCCGAGCCGCGCTGGCTCGAGGTTGAGTC  
GACAAGCGCAGACCCGCTGGCGTGCATGACCGCAAAACGCCGCAACCGGTGACCGTGTGCTCAAGG  
CGCTGGGCTGGGACAGCAGATTGTCAGGGTTCGGGTCTCCAGATGACGACCGCTGACGAGTGCATCGACCGCTGGA  
GAAGGACAACACCGTCGGCACCGACGAGGGCTGTGGACATCTACCCAAAGGTCGGTCCGGGGAGCCC  
CCGACCAAAGAGTCAGCGCAGACGCTGTGGAAAACCTTCTTCAAGGAGAAGCGTACGACCTGGCCC  
GCGTCGGTCGCTAAAGGTCAACAAGAAGTCGGGCTGATGTCGGCAAGGCCATCACGTGTCGAGCCT  
GACCGAAGAAGACGCTGTCGACCGGACCATCGAATATCTGGTCCGCTTGCAAGGGGTGACACCACGATGACC  
GTTCCGGGCGGGCTCGAGGTGGCGAACGACGACATCGACCAACTTCGGCAACCGCCGCTGGTA  
CGGTGGCGAGGTGATCCAAAACAGATCCGGGTCGGCATGTCGGGATGGAGCGGGGGTCCGGGAGCG  
GATGACCAACCCAGGACGTCGGAGGCGATCACCCGACAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCCGGCG  
ATCAAGGAGTTTCGGCACCGCAGGCAATTGACGACCAAGAACACCCGCTGTCGGGGTTGA  
C TAC TAGCGCCGACTGTCGGCTGGGGGCGGGCTGTGACGTGACCGTGGGGCTGGAGGTTCCG  
CGACGTGCAACCGCTGCACTACGCCGGATGTGGCGATGAAAACCCCTGAGGGGCCCCAACATCGGTCTG  
ATCGGCTCGTGTGGTGTACGCCGGTCAACCCGGTGGGTTCATCGAAACCGCCGACCGGAGGTGG  
TCGACGGCTGGTTAGCGACGAGATCGTGTACCTGACCCGGACGAGGAGGACGCCACGTGGTGGACA  
GGCCAATTGCGCGATCGATCGGGACGGCTGGTGTGGGGGGTCTGGTCCCGGCAAGGCGGG  
GAGGGTGGAGTACGTGCCCTCGTGTGGGGACTACATGGACGCTCTCGCCCGGCAAGATGGTGTGGTGG  
CCACCGCGATGATTCCCTTCGGAGCACGACGCCAACCGTGGCCATGGGGCAAAACATGCAAGCG  
CCAGGGCGTGCCTGGTGTGGACGGGGGGCTGGTGGGACCCGGGATGGAGCTGGCGCGGGGATC  
GACGCCGGCGACGTGTCGTCGCCGAAGAAAAGCGGCGTACATCGAGGGAGGTGTGGCCGACTACATCACTG  
TGATGACGACAACGGCACCCGGCTACCTACCGGATGCGCAAGTTGCCCCTGGTCAACCCACGGCACTTG  
CGCCAACCACTGCCCCATCGGGACGCCGGGACCGAGTGTGGCCGAGGTGATGCCGACGGTCCC  
TGTACTGACGACGGCGAGATGGCCTGGGCAAGAACCTGTTGTCGTCATCATGCGGGTGGGACA  
ACTACGAGGACCGGATCATCTGTCCAACCCGCTGGTCAAGGAGGACTGTGTCACCTCGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGATCGATGCTCGCACCAAGCTGGGTGCGGAGGAGATCACCCGCAACATCCGAAACATC  
TCCGACGAGGTGCTCGCGACCTGGATGAGCGGGGATCGTGTGCGCATGGTGGCCAGGGTTGCGGACGGGG  
ACATCTGGTGGCAAGGTCAACCCGAGGGTGAACGGGACTGACGCCGGAGGAGGGCTGTGCGTGC  
CATCTGGTGGAGAAGGCCGAGGGTGCACGCAACTTCGCTGAAGGTGCCGACGGCAATCCGCAAG  
GTGATCGGATTGGGTGTTTCCCGCGAGGACGAGGACGAGTTGCCGGGGGGTGTCAACGAGCTGGTC  
GTGTGTATGTGGCTAGAAACGCAAGATCTCGACGGTGAACAGCTGGCCGGGGCGACGGCAACAGGG  
CGTGATCGCAAGATCTGCCGGTTGAGGACATGCCGTTCTTGCGACGGCACCCGGTGGACATTATT  
TTGAACACCCACGGCGTCCGCGACGGATGACATCGCCAGATTTGGAGACCCACCTGGTTGGTGTG  
CCCACAGCGGCTGGAAAGGTGACGCCGCAAGGGGGTCCGGACTGGCCGCCAGGCTGCCGAGGA  
GCTCGAGGGCGAGCCGAACGCCATTGTGTCGACGCCGGTGTGACGCCGCCAGGAGGCGAGCTGCA  
GGCCTGGTGTGCGACGCTGCCAACCGCGACGGTGAACGTGCTGGTCAACGCCGACGGCAAGGCCATGC  
TCTCGACGGCGCAGCGCAGGCCGTTCCGTAACCGGTCACGGTTGCTACATGTACATCATGAAGCT  
GCACCACTGGTGGACGACAAGATCCACGCCGCTCCACCGGGCGTACTCGATGATCACCCAGCG  
CTGGCGGTAAGGCCGAGTTCGGTGGCCAGGGTGTGGGGAGATGGAGTGCTGGGCCATGCAAGGCTACG  
GTGCTGCCACCCCTGCAAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTGGCCGGTCAAGGTGTA  
CGAGGGGATCGTCAAGGGTGAAGAACATCCGGAGGCCATCCCGAGTGTGTCAGGGTGGGCAAC  
GAACGTGAGTCGCTGTGCGCTAACGTGAGGGTGTATCGAGTGAACGGTGGGGGATGAAACTGCG  
GTGAGGGACGAGGACCTGGAGCGGGCCGCGGCCAACCTGGGAATCAATCTGTCCCGCAACGAATCCGCAAG  
TGTGAGGGATCTTGGTAA

## ALINEAMIENTO MULTIPLE DE LAS SECUENCIAS DEL GEN *rpoB* UTILIZANDO LA HERRAMIENTA CLUSTAL W

### Mutación 531

fedora0605_RpoB	TCGGGGTTGACCGACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0708c_RpoB	TCGGGGTTGACCGACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora1005_RpoB	TCGGGGTTGACCTACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0801c_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0402_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0409_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
H37Rv_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0202c_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0208e_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG

### Mutación 526

fedora0605_RpoB	TCGGGGTTGACCGACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0708c_RpoB	TCGGGGTTGACCGACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora1005_RpoB	TCGGGGTTGACCTACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0801c_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0402_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0409_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
H37Rv_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0202c_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG
fedora0208e_RpoB	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCTGGCCTGGGCCCCGGTCTGTACGTGAG

### Mutación 516

fedora0605_RpoB	ATCAAGGAGTTCTCGGACCAGCCAGCTGAGCCAATTATGGACCAGAACACCCGCTG
fedora0708c_RpoB	ATCAAGGAGTTCTCGGACCAGCCAGCTGAGCCAATTATGGACCAGAACACCCGCTG
fedora1005_RpoB	ATCAAGGAGTTCTCGGACCAGCCAGCTGAGCCAATTATGGACCAGAACACCCGCTG
fedora0801c_RpoB	ATCAAGGAGTTCTCGGACCAGCCAGCTGAGCCAATTATGGACCAGAACACCCGCTG
fedora0402_RpoB	ATCAAGGAGTTCTCGGACCAGCCAGCTGAGCCAATTATGGACCAGAACACCCGCTG
fedora0409_RpoB	ATCAAGGAGTTCTCGGACCAGCCAGCTGAGCCAATTATGGACCAGAACACCCGCTG
H37Rv_RpoB	ATCAAGGAGTTCTCGGACCAGCCAGCTGAGCCAATTATGGACCAGAACACCCGCTG
fedora0202c_RpoB	ATCAAGGAGTTCTCGGACCAGCCAGCTGAGCCAATTATGGACCAGAACACCCGCTG
fedora0208e_RpoB	ATCAAGGAGTTCTCGGACCAGCCAGCTGAGCCAATTATGGACCAGAACACCCGCTG

Muestra H37Rv

Gen *inhA*

Wild Type

>H37Rv\_InhA

```
ATGACAGGACTGCTGGACGGAAACGGATTCTGGTAGCGGAATCATACCGACTCGTCATCGCTTTC  
ACATCGCAGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGTCAACC GGTTGACCGGCTGCGCTGAT  
TCAGCGCATACCGACCCGGCTGCCGGCAAAGGCCCCGTGCTGAACCTGACGTGAAAAGGAGCAC  
CTGGCCAGCTTGCCGGCGGGTGAACGGGAGCTGGTGTCAACC GGTTGACCGGCTGCGCTGCGAT  
CGATTGGGTTCATGCCAGACCCGGATGGGATCAACCCGGCTTGTGACGCGCCATCGGGATGTGTC  
CAAGGGCATCCACATCTGGCGTATTCGTATGCTTGATGCCAAGGGCTGCTGCCATCGGGATGTGTC  
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGGGAGCTGGGATGCCGCGCTACAAGTGGATGACGGTGC  
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTGTGGCGAGGCCGGAAGTACGGTGTGCGTTGAA  
TCTCGTTGCCAGGGCCATCCGGCTGCTGGCGATGAGTGCATCGTGGCGTGCCTCGCGAGGAG  
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG  
ATGCGACGCCGGTCGCCAAGACGGTGTGCGCTGCTGACTGGCTGCCGGGACACGGGTGACAT  
CATCTACGCCAGGGCGCGCACACCCATTGCTCTAG
```

Aislado 0202

Gen *inhA*

Mutación Wild Type

>fedora0202c\_InhA

```
ATGACAGGACTGCTGGACGGAAACGGATTCTGGTAGCGGAATCATACCGACTCGTCATCGCTTTC  
ACATCGCAGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGTCAACC GGTTGACCGGCTGCGCTGAT  
TCAGCGCATACCGACCCGGCTGCCGGCAAAGGCCCCGTGCTGAACCTGACGTGAAAAGGAGCAC  
CTGGCCAGCTTGCCGGCGGGTGAACGGGAGCTGGGATGCCGATCAACCCGGCTTGTGACGCGCCATCGGGATGTGTC  
CGATTGGGTTCATGCCAGACCCGGGATGGGATCAACCCGGCTTGTGACGCGCCATCGGGATGTGTC  
CAAGGGCATCCACATCTGGCGTATTCGTATGCTTGATGCCAAGGGCTGCTGCCATCGGGATGTGTC  
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGGGAGCTGGGATGCCGCGCTACAAGTGGATGACGGTGC  
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTGTGGCGCGAGGCCGGAAGTACGGTGTGCGTTGAA  
TCTCGTTGCCAGGGCCATCCGGCTGCTGGCGATGAGTGCATCGTGGCGTGCCTCGCGAGGAG  
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG  
ATGCGACGCCGGTCGCCAAGACGGTGTGCGCTGCTGACTGGCTGCCGGGACACGGGTGACAT  
CATCTACGCCAGGGCGCGCACACCCATTGCTCTAG
```

Aislado 0208  
Gen *inhA*  
Mutación Wild Type

```
>fedora0208e_InhA
ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTAGCGAATCATCACCAGTCGATCGCGTTTC
ACATCGCACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCCTACCGGGTTCGACCGGCTGCGCTGAT
TCAGCGCATACCGACCGCTGCCGGCAAAGGCCCCCTGCTGAACCTGACGTGCAAAACGAGGAGCAC
CTGGCCAGCTTGGCCGGCGGGTGACCGAGGGGATCGGGCAACAAGCTGACGGGTGGTGCATT
CGATTGGGTTCATGCCAGACCGGGATGGGATCAACCCGTTCTCGACGCGCCCTACCGGGATGTGTC
CAAGGGCATCCACATCTCGCGTATTGATGCTCGATGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCC
GGAGGTTCCATCGTGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGATGCCGGCTACAACTGGATGACGGTCG
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGGCGCGAGGCCGCAAGTACGGTGTGCGTTGAA
TCTCGTTGCCGAGGCCCCATCCGGACGCTGGCGATGAGTGCATCGTCCGGGTGCGCTGGGAGGAG
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCGATCGGCTGGAACATGAAGG
ATGCACGCCGGTCGCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTGACTGGCTGCCGGGACCCACGGGTGACAT
CATCTACGCCAGGGCGCGCACACCCATTGCTCTAG
```

Aislado 0402  
Gen *inhA*  
Mutación Wild Type

```
>fedora0402_InhA
ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTAGCGAATCATCACCAGTCGATCGCGTTTC
ACATCGCACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCCTACCGGGTTCGACCGGCTGCGCTGAT
TCAGCGCATACCGACCGCTGCCGGCAAAGGCCCCCTGCTGAACCTGACGTGCAAAACGAGGAGCAC
CTGGCCAGCTTGGCCGGCGGGTGACCGAGGGGATGCCGATGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCC
CGATTGGGTTCATGCCAGACCGGGATGGGATCAACCCGTTCTCGACGCGCCCTACCGGGATGTGTC
CAAGGGCATCCACATCTCGCGTATTGATGCTCGATGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCC
GGAGGTTCCATCGTGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGATGCCGGCTACAACTGGATGACGGTCG
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGGCGCGAGGCCGCAAGTACGGTGTGCGTTGAA
TCTCGTTGCCGAGGCCCCATCCGGACGCTGGCGATGAGTGCATCGTCCGGGTGCGCTGGGAGGAG
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCGATCGGCTGGAACATGAAGG
ATGCACGCCGGTCGCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTGACTGGCTGCCGGGACCCACGGGTGACAT
CATCTACGCCAGGGCGCGCACACCCATTGCTCTAG
```

Aislado 0409

Gen *inhA*

Mutación Wild Type

```
>fedora0409_InhA
ATGACAGGACTGCTGGACGGAAACGGATTCTGGTAGCGGAATCATCACCAGTCGATCGCGTTTC
ACATCGCACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTCTCACCGGGTTGACCCGGCTGCGGCTGAT
TCAGCGCATACCGACCGCTGCCGGCAAAGGCCCCGCTGCTGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC
CTGGCCAGCTTGGCCGGCGGGTACCGAGGGCAGTCGGGCGGGCAACAAGCTGACGGGGTGGTGCATT
CGATTGGGTTCATGCCAGACCGGGATGGGATCAACCCGTTCTTCGACGCGCCCTACCGGGATGTGTC
CAAGGGCATCCACATCTCGCGTATTGTATGCTTCGATGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCC
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCAGCCGGCGATGCCGCCCTACAACGGATGACGGTCG
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGGCGCGAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTGAA
TCTCGTTGCCAGGGCCCTATCCGACGCTGGCGATGAGTGCATCGTCCGGTGGCTCGGAGGAG
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG
ATGCACGCGCGTCGCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGACTGGCTGCCGGGACACCGGGTACAT
CATCTACGCCAGGGCGCGCACACCCAAATTGCTCTAG
```

Aislado 0605

Gen *inhA*

Mutación Wild Type

```
>fedora0605_InhA
ATGACAGGACTGCTGGACGGAAACGGATTCTGGTAGCGGAATCATCACCAGTCGATCGCGTTTC
ACATCGCACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTCTCACCGGGTTGACCCGGCTGCGGCTGAT
TCAGCGCATACCGACCGCTGCCGGCAAAGGCCCCGCTGCTGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC
CTGGCCAGCTTGGCCGGCGGGTACCGAGGGCAGTCGGGCGGGCAACAAGCTGACGGGGTGGTGCATT
CGATTGGGTTCATGCCAGACCCGGATGGGATCAACCCGTTCTTCGACGCGCCCTACCGGGATGTGTC
CAAGGGCATCCACATCTCGCGTATTGTATGCTTCGATGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCC
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCAGCCGGCGATGCCGCCCTACAACGGATGACGGTCG
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGGCGCGAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTGAA
TCTCGTTGCCAGGGCCCTATCCGACGCTGGCGATGAGTGCATCGTCCGGTGGCTCGGAGGAG
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG
ATGCACGCGCGTCGCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGACTGGCTGCCGGGACACCGGGTACAT
CATCTACGCCAGGGCGCGCACACCCAAATTGCTCTAG
```

Aislado 0708  
Gen inhA  
Mutación Wild Type

```
>fedora0708c_InhA
ATGACAGGACTGCTGGACGGAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATCACCAGACTCGTCGATCGCGTTTC
ACATCGCACGGGTAGCCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGTCAACC GGTTGACCCGGCTGCGGCTGAT
TCAGCGCATCACCGACCGGCTGCCGGCAAAGGCCCCGCTGCTGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC
CTGGCCAGCTGGCCGGCGGGTGACCGAGGCATCGGGGCGGCAACAAGCTGACGGGTGGTGCATG
CGATTGGGTTATGCCGACACCGGGATGGCATCAACCCGTTCTTCGACCGCCCTACGCCGGATGTGTC
CAAGGGCATCCACATCTCGCGTATTGTTGCTGATGGCCAAGGGCGCTGCGGATCATGAACCCC
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGCGATGCCGGCTACAACTGGATGACGGTCG
CCAAGAGCGCGTGGAGTCGGTCAACAGGTTGTTGCGCGCAGGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTGAA
TCTCGTTGCCGAGGGCCCTATCCGGACGCTGGCGATGAGTGCATGTCGGCGGTGCGCTCGGCGAGGAG
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG
ATGCGACGCCGGTCGCCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGACTGGCTGCCGGGACCAACGGGTGACAT
CATCTACGCCGACGGCGGGCGCGCACACCCAAATTGCTCTAG
```

Aislado 0801  
Gen inhA  
Mutación Wild Type

```
>fedora0801c_InhA
ATGACAGGACTGCTGGACGGAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATCACCAGACTCGTCGATCGCGTTTC
ACATCGCACGGGTAGCCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGTCAACC GGTTGACCCGGCTGCGGCTGAT
TCAGCGCATCACCGACCGGCTGCCGGCAAAGGCCCCGCTGCTGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC
CTGGCCAGCTGGCCGGCGGGTGACCGAGGCATCGGGGCGGCAACAAGCTGACGGGTGGTGCATT
CGATTGGGTTATGCCGACACCGGGATGGGATCATCAACCCGTTCTTCGACCGCCCTACGCCGGATGTGTC
CAAGGGCATCCACATCTCGCGTATTGTTGCTGATGGCCAAGGGCGCTGCGGATCATGAACCCC
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGCGATGCCGGCTACAACTGGATGACGGTCG
CCAAGAGCGCGTGGAGTCGGTCAACAGGTTGTTGCGCGCAGGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTGAA
TCTCGTTGCCGAGGGCCCTATCCGGACGCTGGCGATGAGTGCATGTCGGCGGTGCGCTCGGCGAGGAG
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG
ATGCGACGCCGGTCGCCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGACTGGCTGCCGGGACCAACGGGTGACAT
CATCTACGCCGACGGCGGGCGCGCACACCCAAATTGCTCTAG
```

Muestra 1005  
Gen *inhA*  
Mutación Wild Type

```
>fedora1005_InhA
ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATACCGACTCGTCGATCGCGTTTC
ACATCGCACGGGTAGCCCCAGGAGCAGGGCGCCCAAGCTGGTGCCTCACCGGGTTCGACCGGCTGCGGCTGAT
TCAGCGCATACCGACC GGCTGCCGCAAAGGCCCCGCTGCTCGAACCTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC
CTGGCCAGCTTGGCCGGCCGGGTGACCGAGGCATCGGGGCGGGCAACAAGCTCGACGGGTGGTGCATT
CGATTGGGTTCATGCCGCAGACCGGGATGGGCATCAACCCGTTCTCGACGCCCTACGCCGGATGTGTC
CAAGGGCATCCACATCTCGCGTATTGTATGCCAAGGCCTGCTGCCATCATGAACCCC
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGCGATGCCGCTACAACTGGATGACGGTCG
CCAAGAGCGCGTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGGCGCGAGGCCGCAAGTACGGTGTGCGTTGAA
TCTCGTTGCCGAGGCCCTATCCGGACGCTGGCATTGAGTCCGATCGTCGGCGTCCGCGAGGAG
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCGATCGGCTGGAACATGAAGG
ATGCGACGCCGGTCGCGAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTGACTGGCTGCCGGGACCCACGGGTGACAT
CATCTACGCCGACGGCGGCCGCGCACACCCAAATTGCTCTAG
```

Muestra H37Rv  
Gen *inhA mabA*  
Wild Type

```
>H37Rv_MabA_promoter
GTGGACATAACCGATTTGGCCCCGGCCGCGCGAGACGATAAGTTGTCGGG
```

Muestra 0202  
Gen *inhA mabA*  
Mutación c 15t

```
>fedora0202c_MabA_promoter
GTGGACATAACCGATTTGGCCCCGGCCGCGCGAGATGATAAGTTGTCGGG
```

Muestra 0208  
Gen *inhA mabA*  
Mutación c 15t

```
>fedora0208e_MabA_promoter
GTGGACATAACCGATTTGGCCCCGGCCGCGCGAGATGATAAGTTGTCGGG
```

Muestra\_0402

Gen inhA mabA

Mutación Wild type

>fedora0402\_MabA\_promoter

TGGAACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAAGTTGTCGGG

Muestra\_0409

Gen inhA mabA

Mutación Wild type

>fedora0409\_MabA\_promoter

TGGAACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAAGTTGTCGGG

Muestra\_0605

Gen inhA mabA

Mutación c 15t

>fedora0605\_MabA\_promoter

TGGAACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGATGATAAGTTGTCGGG

Muestra\_0708

Gen inhA mabA

Mutación c 15t

>fedora0708c\_MabA\_promoter

TGGAACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGATGATAAGTTGTCGGG

Muestra\_0801

Gen inhA mabA

Mutación Wild type

>fedora0801c\_MabA\_promoter

TGGAACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAAGTTGTCGGG

Muestra\_1005

Gen inhA mabA

Mutación Wild type

>fedora1005\_MabA\_promoter

TGGAACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAAGTTGTCGGG

**ALINEAMIENTO MULTIPLE DE LAS SECUENCIAS DEL GEN *inhA***  
***mabA* (promotor) UTILIZANDO LA HERRAMIENTA CLUSTAL W**

H37Rv GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor0202c GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor0208e GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor0402 GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor0409 GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor0605 GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor0708c GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor0801c GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor1005 GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGAGACGATAGGTTGTCGGG

De manera resumida la Tabla 7 muestra las mutaciones no sinónimas identificadas en los productos de secuenciación de los 67 aislados MDR

**TABLA 7 AISLADOS MULTIDROGA RESISTENTE (MDR)**

ID	Provincia	MUTACIÓN		
		InhA	KatG	rpoB
0201	CHIRQUI	—	S315T	S531L
0202	COLON	C 15T	—	D516F
0203	COMARCA NGOBE BUGLE	C 15T	S315T	S531L
0205	COLON	—	S315T	S531L
0206	PANAMA ESTE	C 15T	—	S531L
0207	COLON	—	S315T	S531L
0208	COLON	C 15T	—	D516F
0209	CHIRQUI	—	S315T	S531L
0301	PANAMA OESTE	—	S315T	S531L
0303	PANAMA ESTE	C 15T	—	S531L
0304	COMARCA NGOBE BUGLE	—	S315T	S531L
0305	SAN MIGUELITO	—	—	S531L
0306	COLON	—	S315T	S531L
0307	COLON	—	S315T	S531L
0308	COLON	—	S315T	S531L
0309	PANAMA METRO	C 15T	—	D516F
0311	COLON	—	S315T	S531L
0313	CHIRQUI	—	S315T	S531L
0314	COLON	—	S315T	S531L
0315	PANAMA METRO	C 15T	—	S531L
0316	CHIRQUI	—	S315T	S531L
0317	COLON	—	S315T	S531L
0401	COLON	—	S315T	S531L
0402	PANAMA METRO	—	—	S531L
0403	CHIRQUI	—	—	S531L
0404	CHIRQUI	—	S315T	S531L
0405	SAN MIGUELITO	—	S315T	S531L
0407	COLON	—	S315T	S531L
0408	VERAGUAS	—	—	S531L
0409	BOCAS DEL TORO	—	S315T	S531L
0410	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0411	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0412	COLON	—	S315T	S531L
0501	COLON	—	S315T	S531L
0503	BOCAS DEL TORO	—	S315T	S531L
0505	COLON	—	S315T	S531L
0601	COLON	—	S315T	S531L

**TABLA 7 AISLADOS MULTIDROGA RESISTENTE (MDR)**

ID	Provincia	MUTACIÓN		
		InhA	KatG	rpoB
0602	COMARCA NGOBE BUGLE	—	—	S531L
0603	COLON	—	S315T	S531L
0604	COLON	—	S315T	S531L
0605	PANAMA METRO	C 15T	S315T	H526D
0606	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0607	COCLE	—	S315T	S531L
0609	COLON	—	S315T	S531L
0610	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0611	SAN MIGUELITO	—	S315T	H526D
0702	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0703	COLON	C 15T	—	H526D
0704	PANAMA METRO	—	—	H526D
0707	COLON	—	S315T	S531L
0708	PANAMA METRO	C 15T	—	H526D
0801	SAN MIGUELITO	—	—	—
0802	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0803	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0804	PANAMA OESTE	—	S315T	S531L
0805	PANAMA METRO	—	—	H526D
0902	PANAMA METRO	C 15T	S315T	S531L
0903	CHIRQUI	—	S315T	S531L
0904	COLON	—	S315T	S531L
0906	PANAMA METRO	—	—	H526D
0907	PANAMA METRO	C 15T	—	S531L
0908	PANAMA METRO	—	—	S531L
0909	COLON	—	S315T	S531L
1005	CHIRQUI	—	S315T	H526Y
1006	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
1007	PANAMA METRO	—	—	H526D
1101	PANAMA METRO	C 15T	S315T	D516V

También se analizaron los productos de secuenciación de los 31 aislados sensibles en los cuales no se observó ninguna mutación no sinónima (Tabla 8)

**TABLA 8 AISLADOS SENSIBLES**

ID	Provincia	MUTACIÓN		
		InhA	KatG	rpoB
7	PANAMA METRO	---	---	---
91	PANAMA METRO	---	---	---
92	PANAMA METRO	---	---	---
137	PANAMA METRO	---	---	---
157	COLON	---	---	---
191	PANAMA METRO	---	---	---
211	PANAMA METRO	---	---	---
235	PANAMA METRO	---	---	---
267	PANAMA METRO	---	---	---
268	PANAMA METRO	---	---	---
270	PANAMA METRO	---	---	---
327	PANAMA METRO	---	---	---
330	PANAMA METRO	---	---	---
333	PANAMA METRO	---	---	---
363	PANAMA ESTE	---	---	---
377	COLON	---	---	---
382	PANAMA METRO	---	---	---
386	PANAMA METRO	---	---	---
397	PANAMA METRO	---	---	---
400	PANAMA METRO	---	---	---
402	PANAMA METRO	---	---	---
404	PANAMA METRO	---	---	---
406	PANAMA METRO	---	---	---
425	PANAMA METRO	---	---	---
427	PANAMA METRO	---	---	---
432	PANAMA METRO	---	---	---
437	PANAMA METRO	---	---	---
441	PANAMA METRO	---	---	---
462	COLON	---	---	---
465	COLON	---	---	---
498	PANAMA METRO	---	---	---

## > PCR MULTIPLE ALELO ESPECÍFICO

Luego de realizar PCRMAS a 66 aislados MDR y 31 aislados sensibles utilizando la mezcla de reacción de la Tabla 6 los productos de amplificación fueron detectados a través de electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. La presencia de amplificación observada a través de una banda de peso molecular correspondiente al gen estudiado se interpreta como ausencia de la mutación en la muestra. Por el contrario si no se produce la banda se interpreta como presencia de la mutación en la muestra ya que los cebadores están diseñados para detectar el wild type. Como se muestra en la Figura 9

## PCRMAS

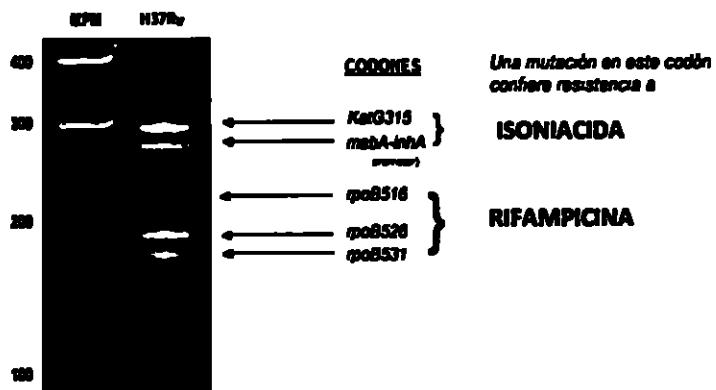
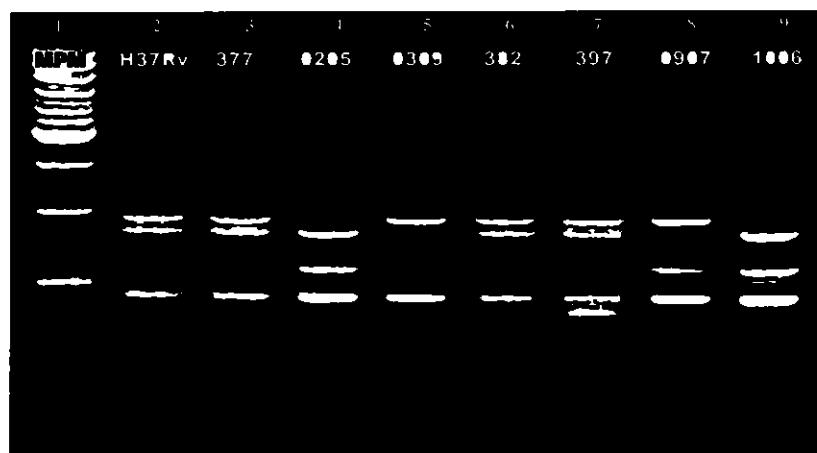


Figura 9

**PCRMAS Electroforesis en gel de agarosa 2 5%**

**Figura 10**



**Figura 10 Electroforesis de los productos de amplificación de PCRMAS**

Carril 1, Marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder / Promega)

Carril 2 H37Rv Cepa de referencia ATCC25177 no presenta mutaciones S315T *katG* c 15t *inhA mabA rpoB516 rpoB526 rpoB531*

Carril 3 aislado 377 no presenta mutaciones S315T *katG* c 15t *inhA mabA rpoB516 rpoB526 rpoB531*

Carril 4 aislado 0205 mutación S315T *katG + rpoB531*

Carril 5 aislado 0309 mutación c 15t *inhA mabA + rpoB516*

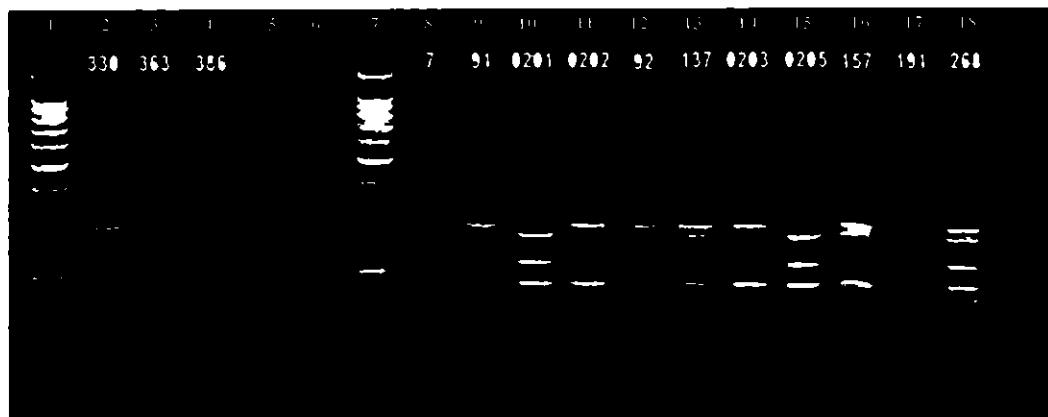
Carril 6 aislado 382 no presenta mutaciones S315T *katG* c 15t *inhA mabA rpoB516 rpoB526 rpoB531*

Carril 7 aislado 397 no presenta mutaciones S315T *katG* c 15t *inhA mabA rpoB516 rpoB526 rpoB531*

Carril 8 aislado 0907 mutación c 15t *inhA mabA + rpoB531*

Carril 9 aislado 1006 mutación S315T *katG + rpoB531*

**Figura 11**



**Figura 11 Electroforesis de los productos de amplificación del PCRMAS**

- Carril 1 Marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder / Promega)  
Carril 2 aislado 330 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* ni en *rpoB531*  
Carril 3 aislado 363 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* ni en *rpoB531*  
Carril 4 aislado 386 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* ni en *rpoB531*  
Carril 7 Marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder / Promega)  
Carril 8 aislado 7 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* ni en *rpoB531*  
Carril 9 aislado 91 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* ni en *rpoB531*  
Carril 10 aislado 0201 mutación S315T *katG* + *rpoB531*  
Carril 11 aislado 0202 mutación c 15t *inhA* *mabA* + *rpoB516*  
Carril 12 aislado 92 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* ni en *rpoB531*  
Carril 13 aislado 137 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* ni en *rpoB531*  
Carril 14 aislado 0203 presenta mutación c 15t *inhA* *mabA* + *rpoB531*  
Carril 15 aislado 0205 presenta mutación S315T *katG* + *rpoB531*  
Carril 16 aislado 157 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* ni en *rpoB531*  
Carril 17 aislado 191 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* ni en *rpoB531*  
Carril 18 aislado 268 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* ni en *rpoB531*

Las siguientes Tablas (9 y 10) muestran las mutaciones identificadas al realizar PCRMAS a cada uno de los 97 aislados en estudio

**Tabla 9 AISLADOS MULTIDROGA RESISTENTE (MDR)**

ID	Provincia	MUTACIÓN		
		InhA	KatG	rpoB
0201	CHIRIQUI	—	S315T	SS31L
0202	COLON	C 15T	—	D516F
0203	COMARCA NGOBE BUGLE	C 15T	—	SS31L
0205	COLON	—	S315T	SS31L
0206	PANAMA ESTE	C 15T	—	SS31L
0207	COLON	—	S315T	SS31L
0208	COLON	C 15T	—	D516F
0209	CHIRIQUI	—	S315T	SS31L
0301	PANAMA OESTE	—	S315T	SS31L
0303	PANAMA ESTE	C 15T	—	SS31L
0304	COMARCA NGOBE BUGLE	—	S315T	SS31L
0305	SAN MIGUELITO	—	—	SS31L
0306	COLON	—	S315T	SS31L
0307	COLON	—	S315T	SS31L
0308	COLON	—	S315T	SS31L
0309	PANAMA METRO	C 15T	—	D516F
0311	COLON	—	S315T	SS31L
0313	CHIRIQUI	—	S315T	SS31L
0314	COLON	—	S315T	SS31L
0315	PANAMA METRO	C 15T	—	SS31L
0316	CHIRIQUI	—	S315T	SS31L
0317	COLON	—	S315T	SS31L
0401	COLON	—	S315T	SS31L
0402	PANAMA METRO	—	—	SS31L
0403	CHIRIQUI	—	—	SS31L
0404	CHIRIQUI	—	S315T	SS31L
0405	SAN MIGUELITO	—	S315T	SS31L
0407	COLON	—	S315T	SS31L
0408	VERAGUAS	—	—	SS31L
0410	PANAMA METRO	—	S315T	SS31L
0411	PANAMA METRO	—	S315T	SS31L
0412	COLON	—	S315T	SS31L
0501	COLON	—	S315T	SS31L
0503	BOCAS DEL TORO	—	S315T	SS31L
0505	COLON	—	S315T	SS31L
0601	COLON	—	S315T	SS31L
0602	COMARCA NGOBE BUGLE	—	—	SS31L

**Tabla 9 AISLADOS MULTIDROGA RESISTENTE (MDR)**

ID	Provincia	MUTACIÓN		
		InhA	KatG	rpoB
0603	COLON	----	S315T	S531L
0604	COLON	—	S315T	S531L
0605	PANAMA METRO	C 15T	S315T	H526D
0606	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0607	COCLE	—	S315T	S531L
0609	COLON	—	S315T	S531L
0610	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0611	SAN MIGUELITO	—	S315T	H526D
0702	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0703	COLON	C 15T	—	H526D
0704	PANAMA METRO	—	—	H526D
0707	COLON	—	S315T	S531L
0708	PANAMA METRO	C 15T	—	H526D
0801	SAN MIGUELITO	—	—	—
0802	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0803	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
0804	PANAMA OESTE	—	S315T	S531L
0805	PANAMA METRO	—	—	H526D
0902	PANAMA METRO	C 15T	S315T	S531L
0903	CHIRQUI	—	S315T	S531L
0904	COLON	—	S315T	S531L
0906	PANAMA METRO	—	—	H526D
0907	PANAMA METRO	C 15T	—	S531L
0908	PANAMA METRO	—	—	S531L
0909	COLON	—	S315T	S531L
1005	CHIRQUI	—	S315T	H526Y
1006	PANAMA METRO	—	S315T	S531L
1007	PANAMA METRO	—	—	H526D
1101	PANAMA METRO	C 15T	S315T	D516V

**Tabla 10 AISLADOS SENSIBLES**

AISLADOS SENSIBLES PCRMAS			MUTACIÓN		
ID	Provincia		InhA	KatG	rpoB
7	PANAMA METRO		---	---	---
91	PANAMA METRO		---	---	---
92	PANAMA METRO		---	---	---
137	PANAMA METRO		---	---	---
157	COLON		---	---	---
191	PANAMA METRO		---	---	---
211	PANAMA METRO		---	---	---
235	PANAMA METRO		---	---	---
267	PANAMA METRO		---	---	---
268	PANAMA METRO		---	---	---
270	PANAMA METRO		---	---	---
327	PANAMA METRO		---	---	---
330	PANAMA METRO		---	---	---
333	PANAMA METRO		---	---	---
363	PANAMA ESTE		---	---	---
377	COLON		---	---	---
382	PANAMA METRO		---	---	---
386	PANAMA METRO		---	---	---
397	PANAMA METRO		---	---	---
400	PANAMA METRO		---	---	---
402	PANAMA METRO		---	---	---
404	PANAMA METRO		---	---	---
406	PANAMA METRO		---	---	---
425	PANAMA METRO		---	---	---
427	PANAMA METRO		---	---	---
432	PANAMA METRO		---	---	---
437	PANAMA METRO		---	---	---
441	PANAMA METRO		---	---	---
462	COLON		---	---	---
465	COLON		---	---	---
498	PANAMA METRO		---	---	---

Cabe señalar que no se pudo realizar PCRMAS al aislado 0409 debido a cantidad insuficiente de ADN. Por lo que en total fueron analizados por PCRMAS 66 aislados MDR más los 31 aislados sensibles como control negativo.

> **COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR PCRMAS CON LOS OBTENIDOS A TRAVÉS DEL MÉTODO DE REFERENCIA.**

Para calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica PCRMAS se comparó los resultados con los obtenidos por el método de referencia método de las proporciones múltiples de Canetti. Los análisis se realizaron para cada una de las drogas de interés Rifampicina (gen *rpoB*) e Isoniacida (genes *katG inhA mabA*)

**Evaluación de PCRMAS versus Gold Standard**

**Resistencia a Rifampicina**

**Sensibilidad de PCRMAS en la detección de mutaciones para Rifampicina**

$$S = [VP / (VP + FN)] * 100$$

$$S = [66 / (66 + 1)] * 100$$

$$S = 98.5\%$$

En donde

S sensibilidad

VP verdaderos positivos según el Gold Standard

FN falsos negativos

### Especificidad de PCRMAS en la detección de mutaciones para Rifampicina

$$E = [VN / (VN + FP)] * 100$$

$$E = [31 / (31 + 0)] * 100$$

$$E = 100\%$$

En donde

E especificidad

VN verdadero negativo segun Gold Standard

FP falso positivo

### Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo de PCRMAS en la detección de resistencia a Rifampicina

#### Cálculo del Valor Predictivo Positivo

$$VPP = [VP / (FP + VP)] * 100$$

$$VPP = [66 / (0 + 66)] * 100$$

$$VPP = 100\%$$

En donde

VPP valor predictivo positivo

VP verdaderos positivos

FP falsos positivos

### **Cálculo del Valor Predictivo Negativo**

$$VN = [VN / (VN + FN)] * 100$$

$$VN = [31 / (31 + 1)] * 100$$

$$VN = 96.8 \%$$

### **Evaluación de PCRMAS versus Gold Standard**

#### **Resistencia a Isoniacida**

##### **Sensibilidad de PCRMAS en la detección de mutaciones para Isoniacida**

$$S = [VP / (VP + FN)] * 100$$

$$S = [66 / (66 + 11)] * 100$$

$$S = 85.7 \%$$

En donde

**S sensibilidad**

**VP verdaderos positivos segun el Gold Standard**

**FN falsos negativos**

##### **Especificidad de PCRMAS en la detección de mutaciones para Isoniacida**

$$E = [VN / (VN + FP)] * 100$$

$$E = [31 / (31 + 0)] * 100$$

$$E = 100\%$$

**En donde**

**E especificidad**

**VN verdadero negativo segun Gold Standard**

**FP falso positivo**

**Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo de PCRMAS en la detección de resistencia a Isoniacida**

**Cálculo del Valor Predictivo Positivo**

$$VPP = [VP / (FP + VP)] * 100$$

$$VPP = [66 / (0 + 66)] * 100$$

$$VPP = 100\%$$

**En donde**

**VPP valor predictivo positivo**

**VP verdaderos positivos**

**FP falsos positivos**

**Cálculo del Valor Predictivo Negativo**

$$VN = [VN / (VN + FN)] * 100$$

$$VN = [31 / (31 + 11)] * 100$$

$$VN = 73.8\%$$

## DISCUSIÓN

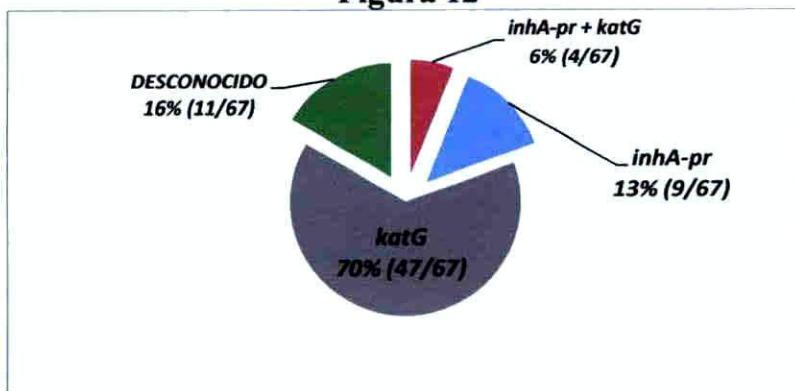
Este estudio ha identificado por primera vez las mutaciones más comunes que confieren resistencia a Isoniacida y Rifampicina en aislados clínicos panameños TB MDR. Además hemos evaluado y confirmado la sensibilidad y especificidad de la técnica PCRMAS como prueba molecular rápida y económica que permitirá la reducción en la demora del diagnóstico actual de los casos MDR en Panamá.

Se detectó en 70 1% de los aislados TB MDR panameños resistentes a INH presentaron la mutación S315T/G en el gen *katG* y en un 19 4% la mutación 15C→T en el operón *mabA inhA*. Estos datos son similares a estudios realizados en otras regiones geográficas los cuales reportan una frecuencia de 60 4 – 93 6% para *katG* en el codón 315 y 1 8 – 50% para mutaciones en la posición 15 del operón *mabA inhA* (121 122, 123 124 119 125 126 127 128 129). Es importante señalar que un 16 4% (11) de los aislados TB MDR resistentes a INH no mostraron mutaciones en ninguno de los genes analizados en este estudio (*katG inhA mabA inhA*) lo cual puede sugerir otros posibles mecanismos de resistencia (menos frecuentes) en otros genes como *ndh*, *iniC efpA ahpC kasA* y otros. Esto significa que las muestras (0305 0402 0403 0408 0602 0704 0801 0805 0906 0908 1007) serían detectados como aislados sensibles a INH por cualquier técnica molecular existente actualmente en el mercado. En estos casos los métodos microbiológicos convencionales de sensibilidad estandar (el método de las proporciones

múltiples de Canetti u otro método convencional como el método de la nitratasa), son las únicas pruebas capaces de detectar la resistencia, ya que la misma es resultado de otros mecanismos menos frecuentes.

Una de las ventajas de identificar las mutaciones genéticas individuales es que permiten determinar el nivel de resistencia al fármaco, así como la probable resistencia cruzada con otros fármacos que estén dentro del esquema de tratamiento. En base a estudios previos <sup>(76,77)</sup> se puede inferir que el 70% de los aislados TB-MDR en Panamá durante la década pasada presentaron un alto nivel de resistencia a INH. Aunado a esto, un 19% de los casos TB-MDR tenían un alto grado de probabilidad de mostrar resistencia cruzada con etionamida, fármaco empleado en el esquema de tratamiento de segunda línea <sup>(65,66,67,68,69)</sup>.

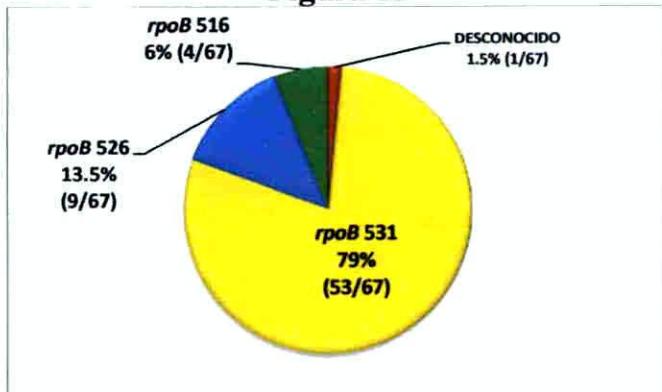
**Mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a INH en aislados MDR**  
**Figura 12**



En relación a las mutaciones que confieren resistencia a Rifampicina se detectó que el codón 531 en el gen *rpoB* fue el sitio mutado más frecuente dentro de los aislados en este estudio (79.1%). Estos resultados son consistentes con otros estudios que han reportado mutación en este sitio en un rango de 40.1 – 82.4% en aislados provenientes de México, Brasil, Cape Town, China, Rusia, Korea, Georgia, Vietnam, India, Países del Este Asiático y Sudáfrica (121, 122, 123, 124, 119, 125, 126, 127, 128, 129). El resto de los aislados presentaron mutación en un 13.4% en el codón 526 y 6.0% en el codón 516, muy similar a lo que se ha reportado también en estos sitios (5.9 – 40% y 2.9 – 16.7%, respectivamente).

Estos resultados permiten inferir que la mayoría de los pacientes con TB-MDR (79%) presentaron un alto nivel de resistencia a RIF y probable resistencia cruzada a todas las rifamicinas (rifabutina y rifapentina) (100).

**Mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a RIF en aislados MDR**  
**Figura 13**



Un caso en particular (0801) fue resistente a RIF por el método convencional gold estándar (método de las proporciones múltiples de Canetti) sin embargo no presentó mutación en el gen *rpoB* que es el responsable del 96 98% de la resistencia a RIF sugiriendo que podría tratarse de otro mecanismo de resistencia menos frecuente a rifampicina

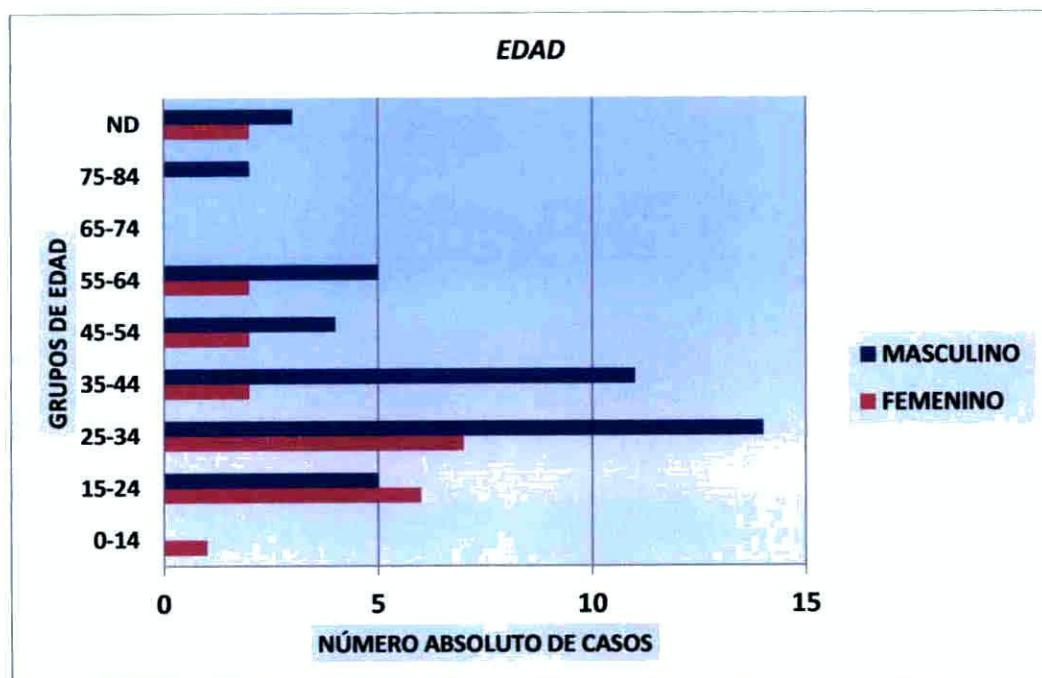
Se puede sugerir que las diferentes cepas de MTB que circulan en Panamá, pueden deberse a diferentes eventos de importación provenientes de diversas partes del mundo por nuestra posición geográfica, económica y turística

Al evaluar la técnica molecular PCRMAS empleada también en otros países con alta carga de casos MDR encontramos un 100% de reproducibilidad al compararse con los resultados de secuenciación y un 85 7% y 98 5% de sensibilidad en la detección de resistencia a INH y RIF respectivamente al ser comparado con el método de las proporciones múltiples de Canetti

Cuarenta y cuatro de los 67 casos analizados en este estudio correspondían a muestras de hombres con un rango de edad de 14 a 81 años (Figura 17)

**Figura 14**

**Rangos de edad versus género de los aislados en estudio**

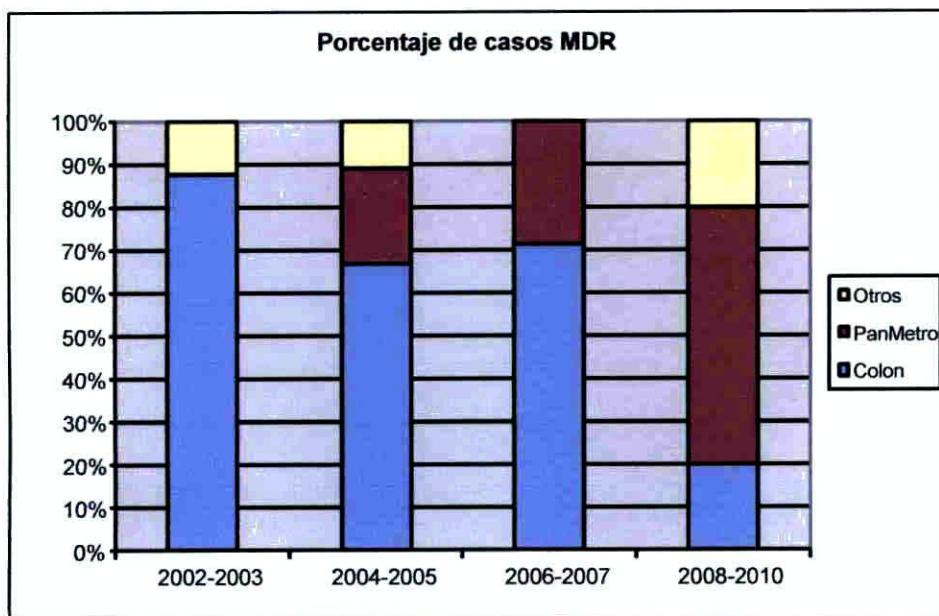


Se detectó una mayor distribución geográfica de los casos en las provincias de Colón (23) y Panamá Metro (21). Estos resultados corresponden con lo presentado en un estudio previo (2002-2004) que reportaron un alto porcentaje de TB-MDR en el área Metropolitana de la ciudad de Panamá y Colón <sup>(120)</sup>.

La información epidemiológica de cada uno de estos aislados data de hace diez años y fue incompleta en la mayoría de los casos, esto no permitió determinar o identificar el caso índice. Sin embargo, al analizar la frecuencia de casos por área geográfica a través de los 10 años, se observó que en los

años 2002-2003 la frecuencia de casos MDR era alta en la provincia de Colón. Durante los años subsiguientes fueron apareciendo casos en Panamá Metro y pocos en otras áreas, con una disminución simultánea de los casos en la ciudad de Colón.

**Figura 15**  
**Porcentaje de casos MDR por año y distribución geográfica**



## **CONCLUSIONES**

- 1 Esta investigación ha permitido identificar y determinar la frecuencia de las mutaciones que confieren resistencia a los dos principales fármacos antituberculosos isoniacida y rifampicina**
- 2 Las mutaciones más comunes en el gen *rpoB* son las responsables de casi el 100% de resistencia a rifampicina en los aislados TB MDR panameños**
- 3 La gran mayoría de la resistencia a isoniacida en Panamá se debe a mutaciones en el gen *katG* y en el promotor *inhA***
- 4 Las ventajas de conocer la frecuencia de las mutaciones que confieren resistencia en los aislados TB MDR que circulan en nuestro país es que nos permite elegir e implementar una técnica molecular que reduce el tiempo de diagnóstico en las instalaciones de salud y además permite inferir el nivel de resistencia a los fármacos o la presencia de resistencia cruzada con otros fármacos del esquema de tratamiento para tuberculosis**

**5 La técnica PCRMAS es un método molecular sensible específico rápido y económico que puede ser utilizado para la detección de las 5 mutaciones más frecuentes y puede ser empleada como una técnica preliminar mientras transcurren las 4 semanas de incubación del metodo de Canetti (técnica Gold Standard de sensibilidad en TB) que confirmará el resultado**

## **RECOMENDACIONES**

- La Organización Mundial de la Salud sugiere cada vez más el uso de técnicas moleculares para la detección de la tuberculosis resistente. El Programa Nacional contra la Tuberculosis de Panamá debe asumir este reto ya que estos métodos reducen considerablemente el tiempo de diagnóstico lo cual representa una interrupción oportuna de la cadena de transmisión de esta enfermedad
- Se requiere de otros estudios para poder dilucidar los mecanismos de resistencia presentes en los aislados que no mostraron las mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a rifampicina y a isoniacida en los genes previamente descritos
- Es necesario realizar investigaciones empleando técnicas de epidemiología molecular que permitan esclarecer la dinámica de la transmisión de la tuberculosis en nuestro país y a su vez evaluar las medidas de control que realiza el programa de tuberculosis a nivel nacional

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. "La tuberculosis en la Región de las Américas. Informe Regional 2011. Epidemiología, control y tratamiento".  
[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=22954&Itemid=](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22954&Itemid=)
2. Organización Mundial de la Salud. "La tuberculosis farmacoresistente alcanza niveles desconocidos hasta ahora". 2010.  
[http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/drug\\_resistant\\_tb\\_20100318/es/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/drug_resistant_tb_20100318/es/)
3. Nobelprize.org. "Robert Koch and Tuberculosis". 2003.  
<http://www.nobelprize.org/educational/medicine/tuberculosis/readmore.html>
4. La Enciclopedia Libre. "Mycobacterium tuberculosis".  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium>
5. Rodríguez, G. "Mycobacterias". Temas de Bacteriología y Virología Médica. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/micobacterias.pdf>
6. Ramirez Rivera N.A., et al. "Mycobacterium tuberculosis: su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa". Revista Médica. Vol 2. Num.2. Jul-Dic 2002.  
[http://www.uv.mx/rm/num\\_anteriores/revmedica\\_vol2\\_num2/articulos/mycobacterium.html](http://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol2_num2/articulos/mycobacterium.html)
7. Brennan PJ. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. Rev Infect Dis 1989;11 Suppl 2:420-430.
8. Warwick JB, Paul W, Winter N. Mechanisms of persistence of mycobacteria. Trends Microbiol 1994;2:284-288.
9. Steck PA, Schwartz MS, Rosenthal G, Gray R. Mycolic acids: a reinvestigation. J Biol Chem 1978;253:5625-5709.
10. Draper P. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. Front Biosci 1998;3:1253-1261.

- 11 Crick DC Mahapatra S Brennan PJ Biosynthesis of the arabinogalactan peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis* *Glycobiol* 2001 11 107R 118R
- 12 Varki A Cummning R, Esko J Freeze H Hart G Marth J Editors *Bacterial polysaccharides In Essential of glycobiology* NY Cold Spring Harbor Press 1999 p 321 332
- 13 Ehlers MR, Daffe M Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol* 1998 6 328 335
- 14 Schabbing RW Garcia A Hunter RL Characterization of the trehalose 6 6 dimycolate Surface monolayer by scanning tunneling microscopy *Infect Immun* 1994 63 754 756
- 15 Wolinsky E *Mycobacterium En* Davis B Dublecco R, Eisen H Génisber H editores *Tratado de microbiología* 3ra ed Mexico Salvat, 1990 p 589 604
- 16 Vergne I Daffe M Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells *Front Biosci* 1998 3 d865-d876
- 17 Brennan PJ Nikaido H The envelope of mycobacteria *Annu Rev Biochem* 1995 64 29 63
- 18 Besra GS Chatterjee J Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis* In Bloom BR, editor *Tuberculosis pathogenesis protection and control* Washington DC ASM Press 1994 p 285 306
- 19 Barnes PF Chatterjee D Abrams JS Lu S Wang E Yamamura M et al Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomanana Relationship to chemical structure *J Immunol* 1992 149 541 547
- 20 St Denis A Caouras V Gervais F Descoteaux A Role of protein kinase C α in the control of infection by intracellular pathogens in macrophage *J Immunol* 1999 163 5505 5511
- 21 Tan SL Parker PJ Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling *Biochem J* 2003 376(Pt 3) 545 552

22. Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis; roles of macrophages and monocytes. Infect Immun 1996; 64: 683-690.
23. Todo lo que necesitas saber para todos. "Lipoarabinomannan, Fondo y Estructura. <http://lasaludfamiliar.com/caja-de-cerebro/conocimiento-3075.html>
24. Ernst JD. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 1998; 66:1277-1281
25. Publicación del genoma.  
[http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs0203/B\\_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm](http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs0203/B_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm)
26. Patogenia e Inmunidad (TB).  
[http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/Academico/Material\\_de\\_Estudio/micobacterias/patologia/patologia.html](http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/Academico/Material_de_Estudio/micobacterias/patologia/patologia.html)
27. Centros para el control y la prevención de enfermedades. "Datos básicos de la Tuberculosis".  
<http://www.cdc.gov/tb/esp/topic/basic/default.htm#ltbi>
28. Wayne LG. Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and latency of disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:908-14.
29. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:267-74.
30. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiol Lett 1994;123:11-8.
31. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:267-74.
32. Combs DL, O'Brien RJ, Geiter LJ. USPHS Tuberculosis Short-Course Chemotherapy Trial 21: effectiveness, toxicity, and acceptability. The report of final results. Ann Intern Med 1990;112:397-406.
33. Bass JB Jr, Farer LS, Hopewell PC, O'Brien R, Jacobs RF, Rubén F, et al. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and

- children American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention Am J Respir Crit Care Med 1994 149 1359 74
- 34 Pere Coll Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis* Enferm Infect Microbiol Clin 2003 21(6) 299 308
- 35 Banerjee A Dubnau E Quemard A Balasubramanian V Um KS Wilson T et al *inhA* a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* Science 1994 263 227 30
- 36 Davidson PT Treatment of mycobacterial infections Bull Int Union Tuberc Lung Dis 1988 63 23 5
- 37 Bloom BR, Murray CJ Tuberculosis Commentary on a reemergent killer Science 1992 257 1055 64
- 38 Dye C Scheele S Dolin P Pathania V Ravaglione MC Consensus statement Global burden of tuberculosis Estimated incidence prevalence and mortality by country WHO Global Surveillance and Monitoring Project Jama 1999 282 677 86
- 39 Haas DW Des Prez RM Tuberculosis and acquired immunodeficiency syndrome A historical perspective on recent developments Am J Med 1994 96 439 50
- 40 Pablos Méndez A Ravaglione MC Laszlo A Binkin N Rieder HL Bustreo F et al Global surveillance for antituberculosis drug resistance 1994 1997
- 41 World Health Organization International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti Tuberculosis Drug Resistance Surveillance N Engl J Med 1998 338 1641 9
- 42 Robitzek, E H & Seikoff I J (1952) Hydrazine derivates of isonicotinic acid (rimifon marsilid) in the treatment of active progressive caseous pneumonic tuberculosis a preliminary report Am Rev Tuberc 65 402-428
- 43 Slayden R A & Barry C E III (2000) The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Microbes Infect 2 659 669

- 44 Quy H T Buu T N Cobelens F G Lan N T Lambregts C S & Borgdorff M W (2006) Drug resistance among smear positive tuberculosis patients in Ho Chi Minh City Vietnam Int J Tuberc Lung Dis 10 160 166
- 45 Balabanova, Y Drobnewski F Fedornin I Zakharova, S Nikolayevskyy V Atun R & Coker R (2006) The Directly Observed Therapy Short Course (DOTS) strategy in Samara Oblast, Russian Federation Respir Res 7 44
- 46 Mackaness G B & Smith N (1952) The action of isoniazid (isonicotinic acid hydrazide) on intracellular tubercle bacilli Am Rev Tuberc 66 125 133
- 47 Suter E (1952) Multiplication of tubercle bacilli within phagocytes cultivated in vitro and effect of streptomycin and isonicotinic acid hydrazide Am Rev Tuberc 65 775 776
- 48 Tsukamura, M Tsukamura, S & Nakano E (1963) The uptake of isoniazid by mycobacteria and its relation to isoniazid susceptibility Am Rev Respir Dis 87 269 275
- 49 Bardou F Raynaud C Ramos C Laneelle M A & Laneelle G (1998) Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis* Microbiology 144 (Pt 9) 2539 2544
- 50 Gangadharam P R Harold, F M & Schaefer W B (1963) Selective inhibition of nucleic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* by isoniazid Nature 198 712 714
- 51 Brennan P J Rooney S A & Winder F G (1970) The lipids of *Mycobacterium tuberculosis* BCG fractionation composition, turnover and the effects of isoniazid Ir J Med Sci 3 371 390
- 52 Winder F G & Collins P B (1970) Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* J Gen Microbiol 63 41-48
- 53 Takayama, K Schonoes H K Armstrong E L & Boyle R W (1975) Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* J Lipid Res 16 308 317

54. Publicación del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* [http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs0203/B\\_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm](http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs0203/B_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm)
55. Chirala SS, Wakil SJ. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids* 2004; 39: 1045-53.
56. Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, Al-Feel W, Hsu M, bu- Elheiga L, et al. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8695-9.
57. Kuziora MA, Chalmers Jr JH, Douglas MG, Hitzeman RA, Mattick JS, Wakil SJ. Molecular cloning of fatty acid synthetase genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1983; 258: 11648-53.
58. Sintchenko V, Chew WK, Jelfs PJ, Gilbert GL. Mutations in *rpoB* gene and rifabutin susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *Pathology* 1999; 31: 257-60.
59. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniowski FA. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1969-73.
60. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, et al. InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994; 263: 227-30.
61. Quemard A, Laneelle G, Lacave C. Mycolic acid synthesis: a target for ethionamide in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1316-21.
62. Baulard AR, Betts JC, Engohang-Ndong J, Quan S, McAdam RA, Brennan PJ, et al. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem* 2000; 275: 28326-31.
63. DeBarber AE, Mdluli K, Bosman M, Bekker LG, Barry III CE. Ethionamide activation and sensitivity in multidrugresistan *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9677-82.

- 64 Vannelli TA Dykman A Ortiz de Montellano PR The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase *J Biol Chem* 2002 277 12824 9
- 65 Hefets LB Antimycobacterial drugs *Semin Respir Infect* 1994 9 84 103
- 66 Lavender C Globan M Sievers A Billman-Jacobe H Fyfe J Molecular characterization of isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Australia *Antimicrob Agents Chemother* 2005 49 4068 74
- 67 Lee H Cho SN Bang HE Lee JH Bai GH Kim SJ et al Exclusive mutations related to isoniazid and ethionamide resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea *Int J Tuberc Lung Dis* 2000 4 441 7
- 68 Morlock GP Metchock B Sikes D Crawford JT Cooksey RC EthA inhA and katG loci of ethionamide resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates *Antimicrob Agents Chemother* 2003 47 3799 805
- 69 Rock CO Cronan JE *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis *Biochim Biophys Acta* 1996 1302 1 16
- 70 Middlebrook, G (1954) Isoniazid resistance and catalase activity of tubercle bacilli a preliminary report *Am Rev Tuberc* 69 471–472
- 71 Rouse D A DeVito J A Li Z Byer H & Morris S L (1996) Site directed mutagenesis of the katG gene of *Mycobacterium tuberculosis* effects on catalase peroxidase activities and isoniazid resistance *Mol Microbiol* 22 583–592
- 72 Cockerill FR III Uhl JR, Temesgen Z Zhang Y Stockman L Roberts GD et al Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase peroxidase (katG) gene associated with isoniazid resistance *J Infect Dis* 1995 171 240 5
- 73 Hofling CC Pavan EM Giampaglia CM Ferrazoli L Ailly DC de Albuquerque DM et al Prevalence of katG Ser315 substitution and rpoB mutations in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil *Int J Tuberc Lung Dis* 2005 9 87 93

- 74 Abate G Hoffner S E Thomsen V O & Miorner H (2001) Characterization of isoniazid resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in katG *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20 329–333
- 75 Musser J M Kapur V Williams D L Kreiswirth B N van Soolingen D & van Embden J D (1996) Characterization of the catalase peroxidase gene (katG) and inhA locus in isoniazidresistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing restricted array of mutations associated with drug resistance *J Infect Dis* 173 196–202
- 76 Rouse D A DeVito J A Li Z Byer H & Morris S L (1996) Site directed mutagenesis of the katG gene of *Mycobacterium tuberculosis* effects on catalase peroxidase activities and isoniazid resistance *Mol Microbiol* 22 583–592
- 77 Saint Joanis B Souchon H Wilming M Johnsson K Alzari P M & Cole S T (1999) Use of site-directed mutagenesis to probe the structure function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase KatG from *Mycobacterium tuberculosis* *Biochem J* 338 (Pt 3) 753–760
- 78 Bertrand, T Eady N A Jones J N Jesmin Nagy J M Jamart Gregoire B Raven E L Brown K A (2004) Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase peroxidase *J Biol Chem* 279 38991–38999
- 79 Mdluli K Slayden R A Zhu Y Ramaswamy S Pan X Mead, D Crane D D Musser J M & Barry C E 3rd (1998) Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta ketoacyl ACP synthase by isoniazid *Science* 280 1607–1610
- 80 Lee A S Teo A S & Wong S Y (2001) Novel mutations in ndh in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates *Antimicrob Agents Chemother* 45 2157–2159
- 81 Piatek, A S Telenti A Murray M R El Hajj H Jacobs W R Jr Kramer F R & Alland, D (2000) Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons implications for rapid susceptibility testing *Antimicrob Agents Chemother* 44 103–110

- 82 Slayden R A Lee R E & Barry C E III (2000) Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis* Mol Microbiol 38 514–525
- 83 Larsen M H Vilchez C Kremer L Besra, G S Parsons L Salfinger M Heifets L Hazbon M H Alland D Sacchettini J C & Jacobs W R Jr (2002) Overexpression of inhA but not kasA confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis* M bovis BCG and M tuberculosis Mol Microbiol 46 453–466
- 84 Kremer L Dover L G Morbidoni H R Vilchez C Maughan W N Baulard, A Tu S C Honore N Deretic V Sacchettini J C Locht, C Jacobs W R Jr & Besra, G S (2003) Inhibition of InhA activity but not KasA activity induces formation of a KasA containing complex in mycobacteria J Biol Chem 278 20547–20554
- 85 Miesel L Weisbrod, T R Marcinkeviciene J A Bittman R & Jacobs W R Jr (1998) NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis* J Bacteriol 180 2459–2467
- 86 Wilson T M & Collins D M (1996) ahpC a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex Mol Microbiol 19 1025–1034
- 87 Telenti A Honore N Bernasconi C March, J Ortega, A Heym B Takiff H E & Cole S T (1997) Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* a blind study at reference laboratory level J Clin Microbiol 35 719–723
- 88 Sherman D R Mdluli K Hickey M J Arain T M Morris S L Barry C E 3rd & Stover C K (1996) Compensatory ahpC gene expression in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* Science 272 1641–1643
- 89 Guimaraes B G Souchon, H Honore N Saint Joanis B Brosch R. Shepard, W Cole S T & Alzari P M (2005) Structure and mechanism of the alkyl hydroperoxidase AhpC a key element of the *Mycobacterium tuberculosis* defense system against oxidative stress J Biol Chem 280 25735–25742

- 90 Sensi P (1983) History of the development of rifampin Rev Infect Dis 5 Suppl 3 S402–S406
- 91 Lounis N & Roscigno G (2004) In vitro and in vivo activities of new rifamycin derivatives against mycobacterial infections Curr Pharm Des 10 3229–3238
- 92 Donald P R Sirgel F A Botha, F J Seifert, H I Parkin D P Vandenplas M L Van de Wal B W Maritz, J S & Mitchison D A (1997) The early bactericidal activity of isoniazid related to its dose size in pulmonary tuberculosis Am J Respir Crit Care Med 156 895–900
- 93 Chan, S L Yew W W Ma, W K Girling D J Aber V R Felmingham D Allen B W & Mitchison, D A (1992) The early bactericidal activity of rifabutin measured by sputum viable counts in Hong Kong patients with pulmonary tuberculosis Tuber Lung Dis 73 33–38
- 94 Grosset, J Lounis N Truffot Pernot, C O'Brien R J Ravaglione M C & Ji B (1998) Once weekly rifapentine-containing regimens for treatment of tuberculosis in mice Am J Respir Crit Care Med 157 1436–1440
- 95 Mitchison D A (1985) [Mechanisms of the action of drugs in the short course chemotherapy] Bull Int Union Tuberc 60 36–40
- 96 Nightingale S D Cameron D W Gordin F M Sullam P M Cohn D L Chaisson R E Eron L J Sparti P D Bihari B Kaufman D L & et al (1993) Two controlled trials of rifabutin prophylaxis against *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS N Engl J Med 329 828–833
- 97 Sullam P M Gordin F M & Wynne B A (1994) Efficacy of rifabutin in the treatment of disseminated infection due to *Mycobacterium avium* complex The Rifabutin Treatment Group Clin Infect Dis 19 84–86
- 98 Benator D Bhattacharya, M Bozeman, L Burman W Cantazaro A Chaisson R Gordin F Horsburgh C R Horton, J Khan A Lahart, C Metchock, B Pachucki C Stanton L Vernon A Villarino M E Wang Y C Weiner M & Weis S (2002) Rifapentine and isoniazid once a week versus rifampicin and isoniazid

- twice a week for treatment of drug-susceptible pulmonary tuberculosis in HIV negative patients a randomised clinical trial *Lancet* 360 528–534
- 99 Vernon A (2000) Rifamycin antibiotics with a focus on newer agents In *Tuberculosis* 2nd edition (Rom W & Garay S eds ) pp 7759–7771 Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia
- 100 Wade M M & Zhang, Y (2004) Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* *Front Biosci* 9 975–994
- 101 Hartmann, G Honikel K O Knusel F & Nuesch, J (1967) The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin *Biochim Biophys Acta* 145 843–844
- 102 Campbell E A Korzheva, N Mustaev A Murakami K Nair S Goldfarb A & Darst, S A (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase *Cell* 104 901–912
- 103 Ramaswamy S & Musser J M (1998) Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis* 1998 update *Tuber Lung Dis* 79 3–29
- 104 Jin D J & Gross C A (1988) Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampicin resistance *J Mol Biol* 202 45–58
- 105 Ovchinnikov Y A Monastyrskaya, G S Guriev S O Kalinina, N F Sverdlov E D Gragerov A I Bass I A Kiver I F Moiseyeva, E P Igumnov V N Mindlin S Z Nikiforov V G & Khesin R B (1983) RNA polymerase rifampicin resistance mutations in *Escherichia coli* sequence changes and dominance *Mol Gen Genet* 190 344–348
- 106 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
- 107 Musser J M (1995) Antimicrobial agent resistance in mycobacteria molecular genetic insights *Clin Microbiol Rev* 8 496–514

- 108 Kapur V Li L L Hamrick M R Plikaytis B B Shinnick T M Telenti A Jacobs W R Jr Banerjee A Cole S Yuen K Y & et al (1995) Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing *Arch Pathol Lab Med* 119 131–138
- 109 Williams D L Waguespack C Eisenach K Crawford, J T Portaels F Salfinger M Nolan, C M Abe C Sticht Groh V & Gillis T P (1994) Characterization of rifampin resistance
- 110 Billington O J McHugh T D & Gillespie S H (1999) Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis* *Antimicrob Agents Chemother* 43 1866–1869
- 111 Kapur V Li L L Iordanescu S Hamrick M R Wanger A Kreiswirth B N & Musser J M (1994) Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas *J Clin Microbiol* 32 1095–1098
- 112 Bodmer T Zurcher G Imboden P & Telenti A (1995) Mutation position and type of substitution in the beta subunit of the RNA polymerase influence in vitro activity of rifamycins in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* *J Antimicrob Chemother* 35 345–348
- 113 Williams D L Spring L Collins L Miller L P Heifets L B Gangadharam P R & Gillis T P (1998) Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross resistance in *Mycobacterium tuberculosis* *Antimicrob Agents Chemother* 42 1853–1857
- 114 Heep M Brandstatter B Rieger U Lehn N Richter E Rusch Gerdes S & Niemann S (2001) Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampinresistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates *J Clin Microbiol* 39 107–110
- 115 Heep M Odenbreit, S Beck, D Decker J Prohaska, E Rieger U & Lehn N (2000) Mutations at four distinct regions of the *rpoB* gene

can reduce the susceptibility of *Helicobacter pylori* to rifamycins  
*Antimicrob Agents Chemother* 44 1713–1715

- 116 Dabbs E R Yazawa, K Mikami Y Miyaji M Morisaki N Iwasaki S & Furukata, K (1995) Ribosylation by mycobacterial strains as a new mechanism of rifampin inactivation *Antimicrob Agents Chemother* 39 1007–1009
- 117 Quan S Venter H & Dabbs E R (1997) Ribosylative inactivation of rifampin by *Mycobacterium smegmatis* is a principal contributor to its low susceptibility to this antibiotic *Antimicrob Agents Chemother* 41 2456–2460
- 118 Yang Z R Durmaz, D Yang S Gunal L Zhang B Foxman A Sanic & C F Marrs (2005) Simultaneous detection of isoniazid, rifampin and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele specific polymerase chain reaction (PCR) assay *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 53 201 208
- 119 Mokrousov I O Narvskaya, T Otten E Limeschenko L Steklova & B Vyshnevskiy (2002) High Prevalence of KatG Ser315Thr Substitution among Isoniazid Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(5) 1417–1424
- 120 High clustering rates of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Panama Rosas et al *BMC Infectious Diseases* 2013 13 442
- 121 Hofling CC Pavan EM Giampaglia CM Ferrazoli L Ailly DC et al (2005) Prevalence of katG Ser315 substitution and rpoB mutations in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil *Int J Tuberc Lung Dis* 9 87–93
- 122 Afanas'ev MV Ikryannikova LN Ilina EN Sidorenko SV Kuz'min AV et al (2007) Molecular characteristics of rifampicin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation *J Antimicrob Chemother* 59 1057–1064
- 123 Caws M Duy PM Tho DQ Lan NT Hoa DV et al (2006) Mutations prevalent among rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a hospital in Vietnam *J Clin Microbiol* 44 2333–2337

- 124 Gegia M Mdivanı N Mendes RE Li H Akhalaia M et al (2008) Prevalence of and molecular basis for tuberculosis drug resistance in the Republic of Georgia validation of a QIAplex system for detection of drug resistance related mutations *Antimicrob Agents Chemother* 52 725–729
- 125 Park YK Shin S Ryu S Cho SN Koh WJ et al (2005) Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea *J Microbiol Methods* 63 165–172
- 126 Qian L Abe C Lin TP Yu MC Cho SN et al (2002) rpoB genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from East Asian countries *J Clin Microbiol* 40 1091–1094
- 127 Ramaswamy SV Dou SJ Rendon A Yang Z Cave MD et al (2004) Genotypic analysis of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey Mexico *J Med Microbiol* 53 107–113
- 128 Van Rie A Warren R, Mshanga I Jordaan AM van der Spuy GD et al (2001) Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high incidence community *J Clin Microbiol* 39 636–641
- 129 Yue J Shi W Xie J Li Y Zeng E et al (2003) Mutations in the rpoB gene of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China *J Clin Microbiol* 41 2209–2212
- 130 Canetti G Rust N Grosset J (1963) Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions Methodology resistance criteria, results and interpretation *Rev Tuberc Penumol (Paris)* Feb Mar 27 217 72
- 131 Gorocica P y cols Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis *Rev Inst Nal Enf Resp Mex Volumen 18 – numero 2 Abril Junio 2005*