

# Determinación de la mutación S315T del gen *katG* en aislados resistentes a Isoniacida de *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-RFLP

Jenny Sánchez-Domínguez<sup>1</sup>, Eva Nicola-Salas<sup>1,2</sup>, Gabriel Morey-León<sup>3,\*</sup>

## Resumen

**Objetivo:** determinar la mutación S315T del gen *katG* en aislados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a isoniácida mediante la técnica PCR-RFLP.

**Materiales y métodos:** A partir de 68 aislados de *Mycobacterium tuberculosis* se realizó el análisis de polimorfismo en productos de amplificación de 1054 y 630 pb que contenían la mutación S315T del gen *katG* mediante PCR-RFLP empleando las enzimas de restricción *MspI* y *SatI*. Mediante SPSS se determinó sensibilidad, especificidad, valores predictivo positivo y negativo, coeficientes de probabilidad positivo y negativo.

**Resultados:** El 74,46% de aislados fenotípicamente resistentes y 4,76% fenotípicamente sensibles presentaron la mutación del gen *katG* S315T. La PCR-RFLP para S315T del gen *katG* presentó 85,4% de sensibilidad y 95,2% de especificidad con *MspI* y 85,4% de sensibilidad y 94,4% de especificidad con *SatI*.

**Discusión:** La PCR-RFLP tiene una alta capacidad resolutive que depende de la enzima que se emplee como se observó en estudios previos. La presencia de la mutación S315T en pacientes vírgenes al tratamiento sugiere la circulación de aislados resistentes a Isoniacida.

**Conclusión:** La PCR-RFLP resultó una alternativa válida y rápida para el diagnóstico de la resistencia a isoniácida, mediante la detección de la mutación S315T del gen *katG* en comparación con el método convencional de las proporciones.

**Palabras Clave:** Mutaciones, Polimorfismo, Isoniacida, PCR-RFLP, *Mycobacterium tuberculosis*, *katG*.

## Determination of S315T mutation within the *katG* gene in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolate by PCR-RFLP

### Abstract

**Objective:** To determine the S315T mutation of the *katG* gene in *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid-resistant isolates by PCR-RFLP.

**Materials and Methods:** Polymorphism analysis of 1054 and 630 bp products containing the S315T mutation of the *katG* gene was performed by PCR-RFLP using the *MspI* and *SatI* restriction enzymes from 68 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, positive and negative likelihood ratio were determined using SPSS.

**Results:** 74.46% of isoniazid-resistant and 4.76% of isoniazid-sensitive isolates showed the S315T mutation in *katG* gene. The PCR-RFLP for S315T of the *katG* gene had 85.4% sensitivity and 95.2% specificity with *MspI* and 85.4% sensitivity and 94.4% specificity with *SatI*.

**Discussion:** The PCR-RFLP has a high resolutive capacity that depends on the enzyme that is used as it was observed in previous studies. The presence of the S315T mutation in treatment-naive patients suggests the circulation of isolates resistant to isoniazid.

**Conclusion:** PCR-RFLP is a valid and rapid alternative for the diagnosis of isoniazid resistance, by detection of S315T mutation in the *katG* gene compared to the conventional method of proportions.

**Keywords:** Mutation, Polymorphism, Isoniazid, PCR-RFLP, *Mycobacterium tuberculosis*, *katG*.

1 Unidad de Postgrado, Investigación y Desarrollo. Universidad de Guayaquil, Casona Universitaria. Chile y Olmedo. Guayaquil 090108, Ecuador.

2 Centro Nacional de Referencia de Micobacterias. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Leopoldo Izquieta Pérez"-INSPI-LIP. Julián Coronel, 905 y Esmeraldas, Guayaquil 090514, Ecuador.

3 Carrera de Obstetricia. Facultad de Medicina. Universidad de Guayaquil, Ciudadela Universitaria, Avenida Kennedy y Avenida Delta. Guayaquil 090514, Ecuador.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: moreyg@live.com

Recibido: 05/09/2017; Aceptado: 03/03/2018

Cómo citar este artículo: J. Sánchez-Domínguez, et al. Determinación de la mutación S315T del gen *katG* en aislados resistentes a Isoniacida de *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-RFLP. Infectio 2018; 22(4): 178-184

## Introducción

La tuberculosis (TB) en la actualidad es considerada como una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, generando cada vez más preocupación por el incremento en la prevalencia de variantes genéticas con resistencia a los fármacos antituberculosos<sup>1</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que, en el año 2015 cerca de 10,4 millones de personas contrajeron la enfermedad a nivel mundial, de las cuales 1,8 millones de personas fallecieron, y el 20% eran TB-MDR (multidrogoresistencia) y de estos un 9,7% de las personas con TB-MDR presentan XDR-TB<sup>2</sup>. Tratamientos subóptimos y la mala adherencia a las terapias de drogas antituberculosas contribuyen al aumento de la resistencia a fármacos; mientras que tratamientos inadecuados aumentan el riesgo de transmisión directa de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a los medicamentos<sup>3-5</sup>. Ecuador se encuentra entre los países priorizados dada la gran carga de la enfermedad y el elevado índice de TB-MDR, reportándose un 4,6% de TB-MDR en 2015<sup>6</sup>.

La isoniacida (INH: Isonicotinic Acid Hydrazide) una de las drogas de primera línea junto a la Rifampicina (RFM), son consideradas las drogas de mayor eficacia frente a una infección por *Mycobacterium tuberculosis*<sup>7</sup>. La INH actúa inhibiendo la biosíntesis de los ácidos micólicos de la pared celular, e ingresa en el *Mycobacterium tuberculosis* como un profármaco por difusión pasiva y es activada por la enzima catalasa-peroxidasa codificada por *katG*, para generar radicales libres, que atacan a continuación múltiples objetivos en las células<sup>8</sup>. Se ha reportado en varios estudios que la resistencia a isoniacida está relacionada con mutaciones específicas en varios genes importantes de *Mycobacterium tuberculosis*, existiendo variantes genéticas tales como: *katG* (S315T, S315N, S315D, S315I, S315R, V61G, Q247H, A62T, G383A, C701G, G1388T), *inhA* (S94A, I21V, I21T, I47T, I194T, 3, 258, 190) y su región promotora (-15 C-T, -8 T-C, T-A ó T-G, -17 G-T), *ahpC*, *nhd*, *kasA*, *oxyR*, *furA*, *fabG*<sup>19-21</sup>, de igual manera, se ha podido mostrar que la aplicación de PCR-RFLP del gen *katG* permite la identificación eficiente de aislados resistentes a isoniacida pudiendo emplearse como una prueba rápida de detección<sup>22-25</sup>.

Aún existiendo evidencia de la aplicación de pruebas moleculares en búsqueda de la resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*, en el Ecuador no existen mayores estudios relacionados a la identificación de mutaciones que interfieren en la acción de las drogas antituberculosas, ni las mutaciones presentes en los genes relacionados a la resistencia a fármacos, limitando la detección de la resistencia a análisis microbiológicos, o escasamente se emplea métodos genotípicos comerciales centrándose solo a la detección de resistencia a Rifampicina (GeneXpert MTB/RIF), excluyendo otras tecnologías que pueden detectar genotípicamente resistencias a otros medicamentos y que se emplean actualmente en varios países<sup>2</sup>. Por lo antes expuesto, el presente estudio propone determinar la mutación S315T del gen *katG* en aislados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a isoniacida mediante la técnica PCR-RFLP utilizando las enzimas de restricción

*MspI* y *SatI*, estrategia que permitiría caracterizar en menor tiempo la resistencia a Isoniacida comparado con el método de las proporciones, sugiriendo su aplicación como método rápido de tamizaje, complementario de las pruebas fenotípicas, que permitan mejorar la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad a nivel país por el conocimiento de variantes genéticas circulantes, personalizando el tratamiento y disminuyendo los índices de TB-MDR.

## Materiales y métodos

Un total de 68 aislados de *Mycobacterium tuberculosis* a los que se les había determinado previamente la resistencia mediante el método de las proporciones de Canetti, Rist y Grosset<sup>23</sup> fueron obtenidos del banco de cepas del Centro de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI "Dr Leopoldo Izquierda Pérez". El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito bajo código 2017-018E.

## Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó de acuerdo al protocolo descrito por van Soolingen *et al.*<sup>24</sup>, con ligeras modificaciones. A partir de 100 µL de aislado de *Mycobacterium tuberculosis* se adicionó 50 µL de lisozima (10mg/ml), incubando a 37°C por una hora, luego se adicionó 80 µL de SDS 10% y 5 µL de proteinasa K (10mg/ml), e incubó a 65°C por 10 minutos; seguido se adicionó 100 µL de NaCl 5M y 100 µL CTAB/NaCl, se mezcló e incubó a 65°C por 10 minutos; posteriormente se agregó 100 µL de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1), se agitó y centrifugó por 20 minutos a 14.000 r.p.m., se transfirió la fase acuosa y adicionó 60 µL de isopropanol al 90% y 2 µL de RNasa, se mezcló e incubó a -20°C hasta el siguiente día. Se centrifugó 20 minutos a 14.000 r.p.m a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se realizaron dos lavados con etanol al 70% centrifugando cada vez por 20 minutos a 14.000 r.p.m., a 4°C. El ADN se resuspendió en 200 µL de buffer TE 1X y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

## Amplificación del gen *katG*

Para determinar el polimorfismo de la región 315 del gen *katG*, dos productos fueron amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores *katG*500fUT1 5'-ACCCAAGTGAATGGAGCATGGGCGGAC3' (1054 pb), *katG*904: 5-AGCTCGTATGGCACCAGAAC-3 (630 pb), respectivamente y *katG*1533rUT2: 5-ACGCACTTGACTTGTCTTCGTCCGGGGTCGTGACCTCCCA-3 (modificado de Herrera-León *et al.*<sup>20</sup>) los cuales reconocen una región circundante del codón 315. Las ampliificaciones se realizaron en un volumen de reacción final de 50µL conteniendo 1X de GoTaq Colorless Master Mix (Promega, Madison, WI 53711 USA) el cual contiene Taq DNA Polimerasa, 400µM dNTPs y 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µM de cada iniciador y 150 ng de ADN extraído. Las ampliificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador C1000 (Bio-Rad Laboratories, CA,

USA) y las condiciones de PCR fueron desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 45 s, hibridación a 65°C por 45 s, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con SYBR safe bajo luz ultravioleta.

### Resultados del PCR-RFLP del gen *katG* con *MspI* y *SatI*

Para la generación de los perfiles de digestión del fragmento amplificado del gen *katG* se utilizó el procedimiento descrito por Leung *et al.*<sup>19</sup>. Los perfiles teóricos fueron analizados previamente "in silico" utilizando el programa online Webcutter 2.0. Los productos amplificados fueron digeridos por separado con las enzimas de restricción *MspI* (Promega, Madison, WI 53711 USA) y *SatI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). La enzima *MspI* reconoce la secuencia de corte C1CGG, y *SatI* GC1NGC, permitiendo detectar la mutación en la posición nucleotídica 945, codón 315 del gen *katG* (AGC →ACC).

Las reacciones de digestión fueron preparadas para un volumen final de 20 µL, conteniendo 3,0 U de enzima *MspI*, 1x del Buffer 10X (suplementado con la enzima), 2 µg de BSA acetilado, 10 µg µL<sup>-1</sup>, y 2,0 U de enzima *SatI*, 1X Buffer Anza™ 10X acorde a las instrucciones del proveedor. Las mezclas de reacciones fueron incubadas a 37°C por 4 horas en un equipo de PCR C1000 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3% en buffer TAE 1X durante 3 horas a 100 voltios, y se visualizó los fragmentos obtenidos bajo luz ultravioleta y digitalizados en un fotodocumentador GelDoc XR (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Los resultados de los perfiles PCR-RFLP de cada enzima fueron interpretados acordes a estudios publicados por Leung *et al.*<sup>19</sup> y Herrera-León *et al.*<sup>21</sup>.

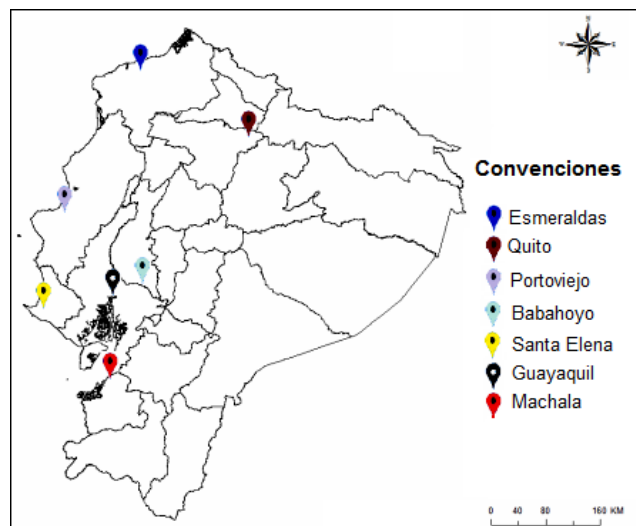
### Análisis de datos

Los datos fueron sistematizados en una hoja de cálculos de Excel diseñada para el estudio la cual incluyó datos epidemiológicos como edad, sexo, procedencia, tipo de muestra, fase de tratamiento, susceptibilidad a isoniacida proporcionados por el Centro de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI "Dr Leopoldo Izquieta Pérez". Los análisis de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN), razón probabilística positiva (LR+) y negativa (LR-) fueron realizados mediante tablas cruzadas de 2 x 2 considerando como prueba estándar los resultados del método de las proporciones empleando el programa para Windows SPSS versión 22 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

### Resultados

De los 68 aislados, 69,1% (47) correspondió a aislados fenotípicamente resistentes y 30,9% (21) a aislados fenotípicamente sensibles de acuerdo al método de las proporciones. 77,9% (53) provenía de hombres y 22,1% (15) de mujeres. 48,0% eran de pacientes vírgenes al tratamiento (VT), 41,0% habían abandonado el tratamiento (AT) y 11,0% se encontra-

ba en control del tratamiento (CT). La mayoría de los aislados provenían de Guayaquil (70,6%), seguidos por los obtenidos en Babahoyo (8,8%), Quito (7,4%), Portoviejo (5,9%), Machala (4,4%), Esmeraldas (1,5%) y Santa Elena (1,5%) (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución geográfica de los aislados resistentes y sensibles a Isoniacida (INH) de *Mycobacterium tuberculosis*. Convenciones presentan la procedencia de los aislados en cada una de las provincias: negro: Guayaquil; marrón: Quito; rojo: Machala; celeste: Babahoyo; amarillo: Santa Elena; lila claro: Portoviejo; azul oscuro: Esmeraldas.

Se observó mediante electroforesis que al emplear PCR-RFLP en el producto de 1054 pb con la enzima *MspI* y *SatI* los aislados resistentes y sensibles fenotípicamente presentaron similar perfil de restricción. A partir del producto de 630 pb se pudo evidenciar la presencia de un fragmento de aproximadamente 132 pb al utilizar *MspI* y 205 pb con *SatI*, en los aislados que presentaban la mutación en el codón 315. Los productos que presentaron bandas diferenciables fueron confirmados por secuenciación (datos no mostrados).

Al emplear las enzimas *MspI* y *SatI* se determinó que un 52,9% de los aislados (35 resistente y 1 sensible) presentó el codón mutado en la posición S315T; un 38,2% y 33,8% no presentaron la mutación; mientras un 8,8% y 13,2% presentaron un perfil no diferenciable para *MspI* y *SatI*, respectivamente.

Los aislados resistentes presentaron similar porcentaje del perfil con mutación (74,5%) con la enzimas *MspI* y *SatI*, mientras que en los aislados sensibles el 4,8% presentó el perfil con mutación para ambas enzimas (Tabla 1).

Al analizar la incidencia de los perfiles con mutación S315T y su relación con los tratamientos antifímicos recibidos, se puede observar que los aislados con mutación presentan igual porcentaje de incidencia entre los obtenidos de personas antes tratadas (AT) y vírgenes al tratamiento (VT) con 23,5% respectivamente, para ambas enzimas utilizadas. En los aislados resistentes fenotípicamente, aquellos que provienen de personas vírgenes al tratamiento, un 34,0% de

**Tabla 1 .** Resultado comparativo de la susceptibilidad de Isoniacida (INH) en aislados de *Mycobacterium tuberculosis* analizados mediante métodos genotípicos y fenotípicos.

N° de aislados (%)	Métodos fenotípicos y genotípicos		
	Método de las Proporciones	PCR-RFLP (n=68)	
		Mspl (n; %)	SatI (n; %)
47 (69,1)	R	R (35/47; 74,5)	R (35/47; 74,5)
	R	S (6/47; 12,8)	S (6/47; 12,8)
	R	ND (6/47; 12,8)	ND (6/47; 12,8)
21 (30,9)	S	R (1/21; 4,8)	R (1/21; 4,8)
	S	S (20/21; 95,2)	S (17/21; 81,0)
	S	ND (-)	ND (3/21; 14,3)

R, resistente; S, sensible; ND, patrones no diferenciado.

estos aislados presentó la mutación, seguido de los antes tratados con 31,9%, para ambas enzimas. En el caso de los aislados sensibles fenotípicamente, un 4,8% de los aislados con la mutación provienen de personas antes tratados, para ambas enzimas utilizadas (Tabla 2).

Para determinar la especificidad y sensibilidad de la PCR-RFLP, el método de las proporciones fue utilizado como la prueba de referencia considerando que es el método estándar empleado en la actualidad para evaluar la resistencia en Ecuador. Se obtuvo 85,4% de sensibilidad y 95,2% de especificidad con *Mspl* y 85,4% de sensibilidad y 94,4% de especificidad con *SatI* para la detección de la resistencia a Isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis* (Tabla 3).

### Discusión

La detección de la resistencia a drogas en pacientes con TB es necesaria para combatir la creciente prevalencia de TB-MDR. En los últimos años se han realizado estudios relacionados con la resistencia a medicamentos que han permitido el desarrollo de métodos fenotípicos y genotípicos<sup>25</sup>.

La secuenciación del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* y la identificación de genes asociados a droga-resistencia, ha permitido la aplicación de métodos de diagnóstico genotípi-

cos tales como PCR-RFLP que ofrecen la posibilidad de identificar mutaciones relacionadas a resistencia<sup>26</sup>. Las mutaciones en los genes de *Mycobacterium tuberculosis katG* e *inhA*, han sido reportados como los responsables del 60 - 80% de los aislados resistentes a isoniacida<sup>27-30</sup>.

En nuestro estudio se observó que la PCR-RFLP tiene una aceptable capacidad resolutive para la detección de resistencia a isoniacida en aislados de *Mycobacterium tuberculosis*, pero se debe tener presente que existen aislados que no presentan la mutación y tienen un patrón fenotípico resistente el cual podría estar relacionado a otros genes que confieren resistencia a isoniacida, de igual manera, dependiendo de las variantes genéticas de la mutación 315 que sean más frecuentes, la capacidad resolutive dependerá de la enzima empleada (*Mspl*: 95,2 (83,8-100,0), *SatI*: 94,4 (81,1- 100,0). Similares resultados han sido descritos por Herrera-León *et al.*,<sup>16</sup> y Mathuria *et al.*,<sup>18</sup>, esto sería debido a que *Mspl* solo detecta la sustitución de Ser→Thr (AGC→ACC), mientras que *SatI* puede detectar las otras sustituciones (AGC→ACC, ACA, ACT, ACG) que ocurren en el codón 315 que afectan los nucleótidos GC en esta posición.

Nuestros resultados mostraron que al emplear las enzimas *Mspl* y *SatI*, el 74,5% de los aislados resistentes presentaron perfil con la mutación S315T, mientras que en los aislados sensibles el 4,8% la presentó. Estos resultados difieren de trabajos previos publicados en los cuales solo se reporta la presencia de perfiles de mutación en la posición S315T en aislados resistentes<sup>7,19,20,22,31</sup>, el 25,5% de aislados fenotípicamente resistentes que no presentaron la mutación estudiada, pudo deberse a la presencia de polimorfismos en regiones diferente a la posición S315T<sup>15-20</sup> en el gen *katG* u otros genes que aporten resistencia a Isoniacida<sup>9-14</sup> indiciendo a la sobreexpresión que superen el poder inhibitorio de INH<sup>26,31</sup>; otra causa puede ser la presencia de mecanismos de resistencia diferente a las mutaciones tales como mecanismos de barrera (reducción de la permeabilidad<sup>32-33</sup> y bomba de eflujo<sup>34-37</sup>). En cuanto a la presencia de un aislado sensible con la mutación S315T, posiblemente se deba a que el límite de la detección por PCR-RFLP empleada se encuentre cercano al 1% de resistentes que basado en el método de las proporciones

**Tabla 2.** Resultado comparativo de la susceptibilidad de Isoniacida (INH) en aislados de *Mycobacterium tuberculosis* analizados mediante PCR-RFLP *Mspl* y *SatI* entre los diferentes tratamientos recibidos.

Método de las proporciones	Tratamiento	PCR -RFLP <i>Mspl</i>		PCR -RFLP <i>SatI</i>	
		Mutante n (%)	Normal n (%)	Mutante n (%)	Normal n (%)
Resistente (n= 47)	AT	15 (31,9)	4 (8,5)	15 (31,9)	4 (8,5)
	VT	16 (34,0)	2 (4,3)	16 (34,0)	2 (4,3)
	CT	4 (8,5)	-	4 (8,5)	-
Sensible (n= 21)	AT	1(4,8)	6 (28,6)	1(4,8)	5 (23,8)
	VT	-	14 (66,7)	-	12 (57,1)
	CT	-	-	-	-

VT, virgen al tratamiento; AT, antes tratados; CT, con tratamiento; ND, no perfil determinado.

**Tabla 3.** Parámetro estadístico de la digestión por PCR-RFLP con *MspI* y PCR-RFLP con *SatI* en relación al método de las proporciones para la detección de la mutación del gen *katG* en aislados resistentes y sensibles a Isoniacida de *Mycobacterium tuberculosis*.

Parámetros estadísticos	PCR-RFLP <i>MspI</i> (n =68, 95% IC)	PCR-RFLP <i>SatI</i> (n =68, 95% IC)
Sensibilidad (%)	85,4 (73,3-97,4)	85,4 (73,3-87,4)
Especificidad (%)	95,2 (83,8-100,0)	94,4(81,1- 100,0)
Valor Predictivo Positivo (%)	97,2	97,2
Valor Predictivo Negativo (%)	76,9	73,9
Razón Probabilística Positiva	17,9	15,4
Razón Probabilística Negativa	0,15	0,15

pasa imperceptible y se considera como sensible, también podría deberse a una inadecuada identificación del perfil de resistencia mediante la prueba de las proporciones en el aislado sensible, y/o contaminación del aislado después de su conservación.

Al analizar los diferentes casos de pacientes con TB, se puede observar que, 46,05% de muestras con el perfil mutado S315T mediante PCR-RFLP correspondió a pacientes antes tratados (AT) y vírgenes al tratamiento (VT), esto sugiere que posiblemente estos pacientes no cumplieron el tratamiento correctamente y/o abandonaron el mismo generando cepas resistentes a esta droga, adicionalmente, que existan paciente sin antecedentes de tratamiento (VT) y que presenten la mutación S315T sugiere que están circulando dentro de la población, aislados de *M. tuberculosis* que presentan resistencia previa a la isoniacida, haciendo poco efectiva la medicación recibida.

La sensibilidad general fue del 85,4% (IC95%:73,3-97,4), en contraste a otros estudios que mostraron 88,2%<sup>23</sup>, 91,5%<sup>38</sup>, 95,0%<sup>39</sup>, sin embargo, presenta un alto valor predictivo positivo (0,972) cuando se lo compara con el método de las proporciones, lo que aseguraría que un 97,2% de los aislados en los cuales se ha detectado mediante PCR-RFLP la mutación S315T tendrían la resistencia al medicamento, siendo un porcentaje útil para la toma de decisiones terapéuticas mientras se obtiene el resultado por cultivo microbiológico, de igual manera, es bien conocido que los valores predictivos de las pruebas son directamente dependientes de la prevalencia de la característica de la población particular<sup>44</sup>, lo cual al considerar la prevalencia de resistentes a Isoniacida de nuestro estudio (69,12%) impacta en la disminución del VPP del test empleado, lo que se mejoraría ampliando la población de estudio.

En relación a las muestras que presentaron patrones no diferenciables (8,8% para *MspI* y 13,2% para *SatI*), es probable que se deba a causas como: la presencia de mecanismos de resistencia diferente a las mutaciones que afectan la permeabilidad de la membrana y bomba de eflujo, la calidad de la muestra, errores técnicos y presencia de inhibidores los cuales pueden afectar la calidad de amplificación y posterior generación del perfil de restricción.

El contar con buenas prácticas de laboratorio, que garanticen condiciones pre-analíticas adecuadas, es primordial con la finalidad de evitar contaminaciones y/o falsos positivos.

Una desventaja de cualquier prueba genotípica es la incapacidad de detectar mutaciones silenciosas (mutaciones que no conducen a ningún cambio de aminoácido). Mutaciones en otras regiones diferentes a la S315T dentro del mismo gen<sup>15-20</sup> u otros genes parte del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* pueden contribuir al desarrollo de la resistencia a isoniacida<sup>9-14</sup>, por lo cual realizar estudios con poblaciones mayores en las que se involucre la identificación de mutaciones de otros genes relacionados a la resistencia en isoniacida u otros medicamentos mejoraría la caracterización de las variantes genéticas presentes en los linajes de *Mycobacterium tuberculosis*, adicionalmente, al conocer las nuevas variantes presentes en los diferentes genes relacionados a la resistencia se aportaría al mejoramiento de los sistemas de detección comerciales actuales, considerando que los aislados presentan variaciones genéticas propias de su distribución geográfica<sup>13-18, 40-43</sup>.

En conclusión, las pruebas moleculares no reemplazan los métodos convencionales, sin embargo, son un eficiente método de tamizaje cuando se combinan con datos clínicos y epidemiológicos, impactando significativamente en una diagnosis temprana de la resistencia, lo que contribuye a estrategias de control de la resistencia de TB en los países<sup>44</sup>. De igual manera, investigaciones dirigidas al estudio de la resistencia por secuenciamiento del genoma completo ayudarían en el futuro a dilucidar los mecanismos moleculares de resistencia a isoniacida u otros medicamentos en aislados de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes en el Ecuador<sup>45-47</sup>. La PCR-RFLP resulta una alternativa confiable y rápida para el diagnóstico de la resistencia a isoniacida, mediante la detección de mutación S315T del gen *katG*, otros codones mutados del mismo gen y/o demás genes que producen resistencia, en comparación con el método convencional de las proporciones.

## Agradecimientos

Agradecemos al Instituto de Investigación en Salud Pública-INSPI "Dr Leopoldo Izquieta Pérez" y sus autoridades por brindarnos las facilidades en la utilización de sus laboratorios y material biológico para el desarrollo de esta investigación. Así también, a todos los que conforman el personal técnico que labora en el Centro de Referencia Nacional de Micobacterias y su responsable por facilitarnos el desarrollo del mismo.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que no han publicado datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes y poseen el consentimiento informado de los pacientes.

### Conflicto de interés

Los autores del presente manuscrito declaran no tener conflicto de interés

### Referencias

- Sakamuri, R. M., Moodley, P., Yusim, K., Fen, S. H., Sturm, A. W., Korber, B. T., et al. Current Methods for Diagnosis of Human Tuberculosis and considerations for Global Surveillance. In: Mukundan H., Chambers M., Waters R., Larsen M., editors. Tuberculosis, Leprosy and Mycobacterial Diseases of Man and Animals: The Many Hosts of Mycobacteria. CAB International, 2015. pp 72-102.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva, Switzerland; WHO press 2016. [consultado 1 Jun 2016]. Disponible en <http://www.who.int/tb/publications>.
- Hoek KG, van Rie A, van Helden PD, Warren RM, Victor TC. Detecting Drug-Resistant Tuberculosis. *Mol. Diagn. Ther.* 2011; 15(4): 189-94.
- Mitchison DA. The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 171(7): 699-706.
- World Health Organization. Ecuador profile. Mortality and burden of disease. Tuberculosis. 2015. [consultado 20 Oct 2017]. Disponible en [https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=/WHO\\_HQ\\_Reports/G2/PROD/EXT/TBCountryProfile&ISO2=EC&outtype=html&LAN=ES](https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=/WHO_HQ_Reports/G2/PROD/EXT/TBCountryProfile&ISO2=EC&outtype=html&LAN=ES)
- Rossetti M. L. R., Valim A. R. D. M., Silva M. S. N., Rodrigues V. S. Resistant tuberculosis: a molecular review. *Rev. Saude Publica.* 2002; 36(4): 525-32.
- Ramaswamy S. V., Reich R., Dou, S. J., Jasperse L., Pan L., Wanger A., et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(4): 1241-50.
- Ajbani, K., Lin, S. Y. G., Rodrigues, C., Nguyen D., Arroyo F., Kaping J., et al. Evaluation of pyrosequencing for detecting extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among clinical isolates from four high-burden countries. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(1): 414-20.
- Mac Aogáin M., Bower J. E., Basu I., Freeman J. T., O'Toole R. F. Draft genome sequence of a drug-susceptible New Zealand isolate of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 3. *Genome Announc.* 2005;3(3): e00499-15.
- Salamon H., Yamaguchi K. D., Cirillo D. M., Miotto P., Schito M., Posey J., et al. Integration of published information into a resistance-associated mutation database for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 2015; 211(suppl 2): S50-7.
- Cabal A., Strunk M., Domínguez J., Lezcano M.A., Vitoria M. A., Ferrero M., et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis used for the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on a pyrosequencing assay. *BMC Microbiol.* 2014; 14(1): 21.
- Rodwell T. C., Valafar F., Douglas J., Qian L., Garfein R. S., Chawla A., et al. Predicting extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* phenotypes with genetic mutations. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(3): 781-9.
- Tseng S. T., Tai C. H., Li C. R., Lin C. F., Shi S. Z. The mutations of *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2014;48: 249 – 55
- Ismail N.A., Ismail M.F., Noor M. D. S. S., Camalxaman S. N. Gene Mutations Associated with Rifampicin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates: A Local Scenario (Kelantan). *Malays J. Med. Sci.* 2016;23 (1): 22 – 6.
- Aung H. L., Tun T., Moradigaravand D., Köser C. U., Nyunt W. W., Aung S. T., et al. Whole-genome sequencing of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Myanmar. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2016; 6: 113 – 7.
- Tekwu E. M., Sidze L. K., Assam J. P. A., Tedom J. C., Tchatchouang S., Makafe G. G., et al. Sequence analysis for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from the Central Region of Cameroon. *BMC Microbiol.* 2014;14: 113.
- Ssengooba W., Meehan C. J., Lukoye D., Kasule G. W., Musisi K., Joloba M. L., et al. Whole genome sequencing to complement tuberculosis drug resistance surveys in Uganda. *Infect. Genet. Evol.* 2016;40: 8 – 16.
- Hazbón M. H., Brimacombe M., del Valle M. B., Cavatore M., Guerrero M. I., Varma-Basil M., et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(8): 2640-49.
- Leung E. T. Y., Kam K. M., Chiu A., Ho P. L., Seto W. H., Yuen K. Y., et al. Detection of *katG* Ser315Thr substitution in respiratory specimens from patients with isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using PCR-RFLP. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52(11): 999-1003.
- Herrera-León L., Molina T., Saiz P., Saez-Nieto J. A., Jiménez M. S. New Multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(1): 144-7.
- Herrera-León L., Pozuelo-Díaz R., Moreno T. M., Cobacho A. V., Vega P. S., Pajares M. S. J. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2009; 27(9): 496-502.
- Mathuria J. P., Nath G., Samaria J. K., Anupurba S. Molecular characterization of INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by PCR-RFLP and multiplex-PCR in North India. *Infect. Genet. Evol.* 2009; 9(6): 1352-5.
- Canetti G., Rist N., Grosset J. M. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Méthodologie, critères de résistance, résultats, interprétation. *Rev. Tuberc. Pneumol.* 1963;27:172-217.
- van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Intern. Med.* 2001; 249(1): 1-26.
- Gupta A., Anupurba S. Detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Methods, principles and applications. *Indian J. Tuberc.* 2015; 62(1): 13-22.
- Cuevas Cordova B., Zenteno Cuevas R. Tuberculosis drogoresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2010; 28(9): 621-8.
- Romay Z., Nailet A., Fuenmayor A., Ramirez C., Rojas L., Paris R. Detección de la Mutación S315T en el gen *katG* como estrategia para identificación de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a isoniacida en un laboratorio de referencia. *Rev. Chilena Infectol.* 2012; 29(6): 607-13.
- Aye K. S., Nakajima C., Yamaguchi T., Win M. M., Shwe M. M., Win A. A., et al. Genotypic characterization of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar. *J. Infect. Chemother.* 2016; 22(3) : 174-9.
- Bollela V. R., Namburete E. I., Feliciano C. S., Macheque D., Harrison L. H., Caminero J. A. Detection of *katG* and *inhA* mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2016; 20(8): 1099-104.
- Jaiswal I., Jain A., Singh P., Verma S. K., Prakash S., Dixit P., et al. Mutations in *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant and -sensitive clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from cases of pulmonary tuberculosis and their association with minimum inhibitory concentration of isoniazid. *Clin. Epidemiol. Glob. Health.* 2017; 5(3): 143-7.
- Arráiz N., Bermúdez V., Urdaneta B. Resistencia a drogas en *M. Tuberculosis*: Bases moleculares. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* 2005;24(1): 23-31.
- Li X. Z., Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 2009;69(12): 1555-623.
- Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2001; 12: 215-23
- De Rossi E., Aínsa J. A., Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006; 30(1): 36-52.
- De Rossi E., Arrigo P., Bellinzoni M., Silva P. A., Martín C., Aínsa J. A., et al. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Med.* 2002; 8(11): 714.
- Balganesh M., Dinesh N., Sharma S., Kuruppath S., Nair A. V., Sharma U. Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(5): 2643-51.

37. Szumowski J. D., Adams K. N., Edelstein P. H., Ramakrishnan L. Antimicrobial efflux pumps and Mycobacterium tuberculosis drug tolerance: evolutionary considerations. In Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis and its Interaction with the Host Organism. Springer Berlin Heidelberg. 2012. pp. 81-108.
38. Riaz M, Mahmood Z, Javed MT, Javed I, Shahid M., Abbas M., et al. Drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified through PCR-RFLP from patients of Central Punjab, Pakistan. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2016; 29(3):443-9.
39. Lin Z., Zaw M. T., Adullah A. F., Thar N. O., Emran N. A., Mustapha Z. A. KatG 315 mutation as a molecular determinant for Isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. Borneo Journal of Medical Sciences. 2017; 11(2): 1-12.
40. Samper, S., Gavín, P., Millán-Lou, M. I., Iglesias, M. J., Jiménez, M. S., Couvin, D., et al. Mycobacterium tuberculosis genotypes and predominant clones among the multidrug-resistant isolates in Spain 1998-2005. Infection, Genetics and Evolution. 2017; 55: 117-126.
41. Nogueira C. L., Prim R. I., Senna S. G., Rovaris D. B., Maurici R., Rossetti M. L., et al. First insight into the molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Santa Catarina, southern Brazil. Tuberculosis. 2016; 97: 57-64.
42. Gagneux, S., Small, P.M. Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development. Lancet Infect. Dis. 2007; 7: 328-337.
43. García de Viedma, D., Mokrousov, I., Rastogi, N. Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2011; 29 (Suppl. 1): 8-13
44. Martínez L. M. W., Castro G. P., Guerrero M. I. A molecular platform for the diagnosis of multidrug-resistant and pre-extensively drug-resistant tuberculosis based on single nucleotide polymorphism mutations present in Colombian isolates of Mycobacterium tuberculosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2016;111(2): 93-100.
45. Yang C., Luo, T., Shen, X., Wu, J., Gan, M., Xu, P., et al. Transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Shanghai, China: a retrospective observational study using whole-genome sequencing and epidemiological investigation. Lancet Infect Dis. 2017; 17(3): 275 - 84.
46. Papaventsis D., Casali N., Kontsevaya I., Drobniowski F., Cirillo D. M., Nikolayevskyy V. Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis for detection of drug resistance: a systematic review. Clin Microbiol Infect. 2017; 23(2): 61 - 8.
47. Votintseva A. A., Bradley P., Pankhurst L., del Ojo Elias C., Loose M., Nilgiriwala K., et al. Same-day diagnostic and surveillance data for tuberculosis via whole-genome sequencing of direct respiratory samples. J. Clin Microbiol. 2017; 55(5): 1285-98.