

Acceso abierto

Artículo original

**Citación**

Franco G, et al. (2017) **Detección de genes asociados a resistencia para isoniacida y rifampicina en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador.** Revista científica INSPIP V. (1), Número 2, Guayaquil, Ecuador.

**Editor**

Patricio Vega Luzuriaga  
Instituto Nacional de  
Investigación en Salud Pública  
(INSPI)

**Recibido:** 04/10/2017**Aceptado:** 09/12/2017**Publicado:** 12/12/2017

El autor declara estar libre de cualquier asociación personal o comercial que pueda suponer un conflicto de intereses en conexión con el artículo, así como el haber respetado los principios éticos de investigación, como por ejemplo haber solicitado permiso para publicar imágenes de la o las personas que aparecen en el reporte. Por ello la revista no se responsabiliza por cualquier afectación a terceros.

**Detección de genes asociados a resistencia para isoniacida y rifampicina en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador**

*Detection of genes associated to resistance for isoniacida and rifampicin in cepas of *Mycobacterium tuberculosis* in Ecuador*

Franco-Sotomayor Greta<sup>1</sup>, León-Benítez Margarita<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Plataforma de genómica. Centro de Referencia Nacional de Micobacterias, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. Dr. Leopoldo Izquieta Pérez. <sup>2</sup> Escuela Superior Politécnica del Litoral (Espol).

**Resumen**

**Antecedentes:** La incidencia de la multidrogorresistencia (MDR) adquirida

a drogas antituberculosas de *Mycobacterium tuberculosis* en el Ecuador es

aproximadamente del 27,83 %. **Objetivo:** Detectar las mutaciones

asociadas con la resistencia a los fármacos en cepas de *M. tuberculosis*

resistentes a fármacos utilizando la PCR-RFLP y PCR en tiempo real.

**Materiales y métodos:** En cepas de *M. tuberculosis* drogorresistentes (DR)

aisladas de muestras provenientes de 18 provincias del Ecuador (2006-

2012), se analizaron mutaciones en los genes *rpoB* y *KatG* que conducen a

la resistencia a rifampicina e isoniazida, respectivamente. EL ADN fue

amplificado por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siendo luego

analizado por RFLP (40 cepas), qPCR (346 cepas).

**Resultados:** Nuestros resultados demostraron una correlación entre la resistencia fenotípica a rifampicina e isoniazida y las mutaciones encontradas en los genes *rpoβ* (91,6 %) y *katG* (90,3 %) en cepas ecuatorianas de *M. tuberculosis*. **Conclusiones:** Las mutaciones asociadas a la drogorresistencia de aislados del *M. tuberculosis* en el Ecuador fueron similares a las reportadas en otros países.

**Palabras claves:** *Mycobacterium tuberculosis*, MDR multidrogorresistente, mutaciones

## Abstract

**Background:** The incidence of multidrug-resistance (MDR) acquired in *Mycobacterium tuberculosis* antituberculosis drugs in Ecuador is approximately 27,83 %. **Objective:** To detect mutations associated with drug resistance in drug-resistant *M. tuberculosis* using PCR-RFLP and real-time PCR. **Materials and methods:** Mutations in *rpoB* and *KatG* genes leading to resistance to rifampicin and isoniazid, respectively, were analyzed in isolates of *M. tuberculosis* (DR) isolated from samples from 18 provinces of Ecuador (2006-2012). The DNA was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and then analyzed by RFLP (40 strains), qPCR (346 strains) and **Results:** Our results demonstrated a correlation between the phenotypic resistance to rifampicin and isoniazid and the mutations found in the *rpoβ* (91, 6 %) and *katG* (90,3%) genes in Ecuadorian *M. tuberculosis* strains. **Conclusions:** Mutations associated with the drug resistance of *M. tuberculosis* isolates in Ecuador were similar to those reported in other countries.

**Key Words:** *Mycobacterium tuberculosis*, multidrug-resistant MDR, mutations

## Introducción

La mortalidad por enfermedades infecciosas sigue siendo una carga importante, especialmente en los países de bajos y medianos ingresos. Este problema aumenta por insuficiencia de recursos en salud pública, largo periodo de desnutrición o diabetes<sup>2</sup>. La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que suele afectar a los pulmones y es causada por una bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) que se transmite de una persona a otra a través de gotículas generadas en el aparato respiratorio de pacientes con enfermedad pulmonar activa<sup>48</sup> y que a nivel mundial causa 8,7 millones de casos nuevos y 1,4 millones de muertes cada año<sup>1,2</sup>. Surgiendo en los últimos años cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la tuberculosis (TB) como una emergencia sanitaria mundial y puso en marcha el "Global Plan to Stop Tuberculosis"<sup>1,3</sup> hasta el 2015 y desde 2016 rige la "Estrategia Fin a la TB", con el objetivo de poner fin a la epidemia mundial de TB y sus indicadores importantes a nivel mundial mencionan: Para 2035, reducción de la mortalidad por TB en un 95 % en comparación con 2015. Para 2035, reducción de la tasa de incidencia de TB en un 90 % en comparación con 2015. Para 2035, que no haya familias que tengan que hacer frente a gastos catastróficos debido a la TB<sup>49</sup>.

Según datos de la OMS<sup>1,3</sup>, el 17 % de las cepas de MTB de casos nuevos y previamente tratados son resistentes por lo menos a un medicamento; 3,3 % de los casos nuevos y 60 % de los antes tratados son MDR (resistentes a isoniacida y a rifampicina),<sup>5,6</sup> de estos el 5 % es XDR (extensivamente drogorresistente)<sup>5,7,8,9</sup>, es decir, resistente a las fluoroquinolonas (ofloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina, etc.) y a drogas inyectables (kanamicina, capreomicina, o amikacina). En el año 2012 en el Ecuador la tasa de incidencia de 59 x 100.000 habitantes, tasa de prevalencia 98 x 100.000 habitantes y tasa de mortalidad<sup>10</sup> 1.8 x 100.000 habitantes<sup>12,13</sup>. Se detectó 1,51 % MDR en casos nuevos y 27,83 % MDR en casos AT (antes tratados). Fuente: Sistema de

información del laboratorio de Micobacterias-INSPI. Datos no publicados<sup>11,12</sup>. Las mutaciones asociadas a cepas altamente resistentes a isoniácida (INH)<sup>20,21,22,23</sup> han sido encontradas con mayor frecuencia en el codón 315 del gen *katG* (76,83 % Ser→Thr). En lo que concierne a la resistencia a rifampicina (RFM)<sup>24,25</sup> se han evidenciado mutaciones en una región de 81-pares de bases (pb) del gen *rpoB* (subunidad beta de la ARN polimerasa), llamada “hot-spot”,<sup>21,28,29</sup> en los codones<sup>26,27</sup> 531 (Ser→ Leu) 37,8 % 526 (His→ Asp) 23 %, y 516 (Asp→Val)(9,46 %).

Nuestro país es uno de los de alta carga de tuberculosis drogorresistente, sin embargo, la prueba tradicional de sensibilidad a los medicamentos anti- TB puede tardar dos y tres meses<sup>48</sup>; para los casos de TB MDR / XDR es absolutamente esencial reducir el tiempo de detección y utilizar métodos de diagnóstico rápido. El diagnóstico rápido de la MDR -TB es extremadamente útil para el pronto establecimiento de un tratamiento eficaz adaptado con mayor precisión en el espectro de sensibilidad de la cepa resistente (lo que reduce el riesgo de desarrollar resistencia adicional a otras drogas) y controlar la propagación de estas cepas. Métodos diagnósticos genéticos reducen el tiempo de diagnóstico de casos de tuberculosis y, sobre todo, el caso de la tuberculosis MDR. Este estudio tiene como objetivo analizar los genes de resistencias de cepas ecuatorianas de *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando dos técnicas moleculares de rápida respuesta diagnóstica.

Este se constituye en el primer estudio en cepas ecuatorianas, demostrando el tipo, frecuencia de mutaciones independientes y sucesivas, que surgen en varias regiones del gen *katG* y *rpoB*; explicando la expresión fenotípica de resistencia a los fármacos<sup>20</sup> isoniácida y rifampicina respectivamente.<sup>16,17,18,19</sup> La genómica junto con la historia clínica de los pacientes permite correlacionar las cepas y su historia evolutiva de resistencia a drogas<sup>8, 14,15</sup>.

## **Materiales y métodos**

### **Aislados clínicos**

Para el presente estudio se analizaron cepas del Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, INSPI, provenientes de 18 provincias del Ecuador durante el periodo 2006-2012 aisladas en medio de Lowenstein Jensen o de Ogawa Kudoh<sup>32</sup>; de este grupo se tomaron como referencia tipo control para el estudio mediante PCR-RFLP y qPCR, los cultivos positivos identificados como *M. tuberculosis*, fueron analizados para determinar la resistencia a diversas drogas antituberculosas por el método de las proporciones de Canetti, Rist y Grosset a las concentraciones inhibitorias mínimas correspondientes a cada droga<sup>31,32,33</sup>, rifampicina (40 µg/ml) e isoniazida (0,2 µg/ml)<sup>46,47</sup>. Se utilizó como control de calidad la cepa de *M. tuberculosis* tipo salvaje H37Rv sensible a todos los medicamentos antituberculosos<sup>23</sup>.

### **Extracción de ADN**

A partir del cultivo se inactivan los aislados por calentamiento a 90°C durante 15 minutos y se procede a la extracción, purificación y amplificación del ADN mediante PCR<sup>30,34</sup>.

### **PCR-RFLP**

Para detectar mutaciones en el codón 315 del gen *katG* de *M. tuberculosis*, se utilizó la reacción en cadena de polimerasa (PCR), acompañada del análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), técnica que puede ser utilizada en la rutina por su sencillez y bajo costo<sup>23,32,33</sup>.

El producto amplificado (377 pb) se analizó por electrophoresis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con Sybergreen y visualizado en transiluminador<sup>5, 23,36</sup> [1] y sometido a digestión con la enzima de restricción MspA1I (sitio de restricción CMG-CKG).

C(A/C)G▼C(G/T)GG(T/G)C▲G(C/A)C

La enzima de restricción reconoce la secuencia intacta del segmento de 377 pb amplificado y es capaz de cortar este en dos fragmentos con una longitud de 309 pb y 68 pb, pero no es capaz de escindir los segmentos que presentan la mutación 315<sup>20, 22,24</sup>. Los patrones de las bandas obtenidas son analizadas en el equipo de documentación de geles GelDoc 2000 de Biorad, con un programa computacional de análisis de imágenes Quantityone. [2].

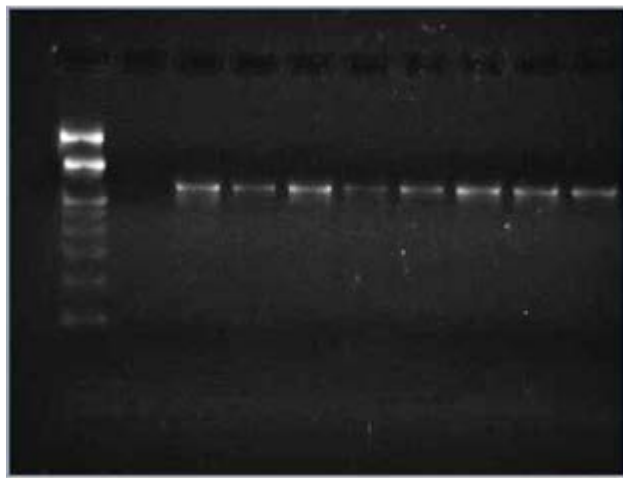


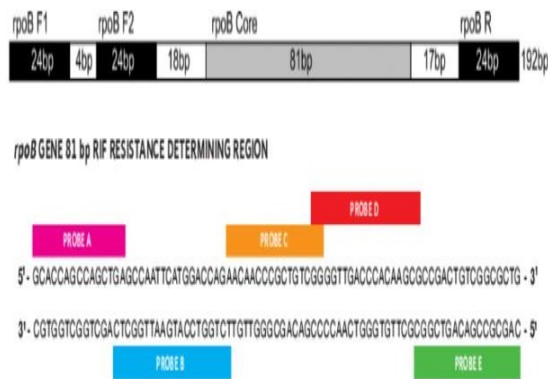
Fig. 1 Amplificación gen katG Línea 1 Marcador de peso molecular, línea 2 Agua, línea 3-10 gen katG amplificado 377 pb



Fig. 2. PCR-RFLP gen katG. Línea 1 marcador de peso molecular, línea 2 control H37Rv cepa salvaje sensible (doble banda), línea 3 y 6 cultivos de MTB sensibles a isoniácida, 4 y 5 cultivos de MTB resistentes a isoniácida (bandaúnica).

### PCR Tiempo Real MTB/RIF

Por recomendaciones de la OPS, la Estrategia Nacional de Control de la Tuberculosis del Ecuador realizó la adquisición e incorporación al diagnóstico de MDR. La técnica utilizada detecta ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas y mutaciones del gen *rpoB* asociadas a la resistencia a la rifampicina<sup>34,35</sup>. El ensayo Xpert MTB/RIF incluye un control de procesamiento de muestra, supervisa la presencia de inhibidores a la PCR<sup>36</sup>, comprobación de sonda, rehidratación de los reactivos y la estabilidad del fluorocromo [3]. Se realizó un análisis comparativo con esta técnica.



**Fig. 3.-** Los iniciadores del ensayo Xpert MTB/RIF amplifican una porción del gen *rpoB*, que contiene la región "central" de 81 pares de bases. Las sondas son capaces de distinguir entre la secuencia salvaje conservada y las mutaciones de la región central que se asocian a la resistencia a RIF.

### Resultados y discusión

Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* ingresadas al estudio, analizadas por los dos métodos fueron por RFLP (40 cepas), PCR tiempo Real "Genexpert" (346 cepas) y 192 cepas fueron enviadas al Instituto Supranacional de Chile para la continuación del estudio en análisis de otras regiones de resistencia a drogas de primera y segunda línea un total de 538. [Tabla2].

PROVINCIAS	CEPAS
AZUAY	4
BOLIVAR	3
CAÑAR	2
COTOPAXI	2
CHIMBORAZO	1
EL ORO	22
ESMERALDAS	18
GUAYAS	374
IMBABURA	1
LOJA	1
LOS RÍOS	28
MANABÍ	4
ORELLANA	2
PICHINCHA	30
SANTA ELENA	6
SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS	2
SUCUMBÍOS	28
TUNGURAHUA	10
<b>TOTAL</b>	<b>538</b>

*Tabla 2.- Cepas y procedencia. En esta tabla se detallan las cepas analizadas en este estudio cultivadas entre los años 2006 al 2012 y su procedencia geográfica.*

### PCR-RFLP

El análisis mediante RFLP del gen katG asociado a la resistencia a isoniácida por cortes con enzima de restricción MspA11 en 40 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, 32 con historial de tratamiento previo y 8 pacientes sin tratamiento previo, dio como resultado lo siguiente:

Doble banda por cortes debido al reconocimiento de la secuencia intacta de la enzima en 23 cepas susceptibles a isoniácida y 3 cepas susceptibles a isoniácida, pero resistente a otros antifímicos.



Banda única por no ser capaz de reconocer y escindir los segmentos que presentan la mutación 315 del gen *katG* en 2 cepas resistentes a isoniácida, 8 cepas resistentes a isoniácida que son MDR, 1 cepa resistente a isoniácida NO MDR, pero además resistente a otros antifímicos.

3 cepas resistentes a isoniácida MDR presentaron doble banda, es decir, la secuencia del gen *katG* se encontraba intacta, lo que indicaría que la resistencia a isoniácida podría estar relacionada con mutaciones en otra región del gen o que otro mecanismo diferente es responsable de esta [Tabla3].

De acuerdo con lo anterior, la detección de la mutación en el gen *katG* como estrategia para la identificación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a isoniácida mostró una sensibilidad de 100 %, una especificidad de 79 %, un valor predictor positivo de 90 % y un valor predictor negativo de 100 % parecida a la encontrada en Venezuela<sup>23</sup>, estudio que exhibió una sensibilidad de 88,24 %, una especificidad de 100 %, un valor predictor positivo de 100 % y un valor predictor negativo de 92 %.

		TÉCNICA: RFLP	
TÉCNICA:	PSDgen	2 BANDAS	1 BANDA
PROPORCIONES	<i>katG</i>	SENSIBLE= NO MUTACIÓN	RESISTENTE= MUTACIÓN
SENSIBLES A HRSEZ	23	23	
RESISTENTE H	2		2
RESISTENTE H-R	4	2	2
RESISTENTE H-R-S	4		4

RESISTENTE H-R-S-Z	1	1	
RESISTENTE H-R-S-E-Z	2		2
RESISTENTE H-E-Z	1		1
RESISTENTE R-Z	2	2	
RESISTENTE S	1	1	
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>29</b>	<b>11</b>

**Tabla 3.-** Análisis de 40 cepas de *M. tuberculosis* por RFLP del gen *katG* por cortes con enzima de restricción *MspA1*

H=Isoniacida, R=Rifampicina, S=Estreptomycin, E= Etambutol, Z= Pirazinamida)

### **PCR Tiempo Real**

En la técnica por PCR Tiempo Real se analizó un total de 346 cepas, 232 provenían de pacientes con un historial de tratamiento previo y 114 correspondieron a pacientes sin tratamiento previo.

De 284 cepas sensibles a rifampicina, según la técnica de proporciones, 275 dieron como resultado Resistencia RFM no detectada y 9 Resistencia a RFM detectada. La técnica de PCR tiempo real es considerada más sensible y específica que la técnica de proporciones y esto explicaría por qué la técnica de proporciones aún no la detecta; estudios similares detectaron mediante evaluación la presencia de resistencia a la rifampicina falsa positiva en Xpert MTB / RIF<sup>50</sup>. En Ecuador por la alta incidencia de tuberculosis resistente una vez detectado por Genexpert la resistencia a rifampicina se ingresa inmediatamente al paciente a tratamiento estandarizado para MDR<sup>51</sup>.

En 56 cepas resistentes a rifampicina MDR, las 56 cepas dieron resistencia a rifampicina detectada.

En 6 cepas resistentes a rifampicina y sensible a los otros fármacos, los resultados dieron en 4 cepas resistencia a RFM detectada y en 2 cepas resistencia a RFM no detectada, lo que indicaría una posible mutación en otra región genética. [Tabla 4]

De acuerdo con lo indicado, la detección de la mutación en el gen *rpoB* como estrategia para la identificación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina mostró una sensibilidad de 96,8 %, una especificidad de 96,7 %, un valor predictor positivo de 99,2 % y un valor predictor negativo de 100 % similar a la encontrada en las comunidades Siria y Libanesa<sup>38</sup>, estudio que mostró que la gran mayoría (95 %) de los aislados estudiados contenían mutaciones en los codones 531 y / o 533 correspondientes a la región de 81 pares de bases del gen *rpoB*.

TÉCNICA: PCR TIEMPO REAL			
MTB/RIF			
TÉCNICA: PROPORCIONES	PSD  rpoB	RESISTENCIA RFM NO DETECTADA	RESISTENCIA A RFM DETECTADA
SENSIBLE RFM	227	224	3
SENSIBLE A RFM RESISTENTE A OTROS	57	51	6
RESISTENTE RFM - SENSIBLE AL RESTO	6	2	4
RESISTENTE RFM - MDR	56	0	56
RESISTENTE RFM NO MDR RESISTENTE A OTROS	0	0	0

**Tabla 4.-** Análisis de 346 cepas de *M. tuberculosis* por PCR tiempo Real Genexpert MTB/RIF

## Conclusiones

La alta prevalencia de las mutaciones en la región de codón katG y rpoβ en las cepas MDR-TB indica el potencial que podrían tener estas pruebas de diagnóstico rápido para la detección de la resistencia a estas drogas en *M. tuberculosis*.

En las cepas resistentes a INH, se observaron 3 cepas resistentes a isoniacida MDR no presentaron mutaciones en el gen katG por observarse la doble banda y que pueden estar asociadas a otros genes, identificados en estudios previos como los genes ahpC, kasA y ndh<sup>42, 43</sup> o que otro mecanismo diferente es responsable de esta resistencia.

Los mecanismos de resistencia a RIF están basados en cambios estructurales de la ARN polimerasa, sugiriendo que la región de la subunidad β de la enzima juega un rol importante en determinar el fenotipo de resistencia. Se observan para la mayoría de los aislados resistentes a RIF<sup>39, 40, 41</sup>, mutaciones especialmente en áreas con alta incidencia de MDR- Tb. En 2 cepas resistentes a RIF no se detectaron mutaciones en la región del gen rpoβ analizadas por PCR Tiempo Real Genexpert MTB/RIF. Este resultado indica que la resistencia a RIF en estas cepas, podría estar relacionado con mutaciones en otra región del gen rpoβ o que otro mecanismo diferente es responsable de esta resistencia<sup>40, 41</sup>. Como la disminución en la permeabilidad de la pared celular o bien a mecanismos de bombas de eflujo<sup>43, 44, 45</sup> de drogas activas, secuestro e inactivación de la droga.

Los estudios realizados a nivel internacional sobre la resistencia fenotípica con mutaciones en los genes rpoβ y katG han demostrado una correlación de 90 % para la resistencia a rifampicina y de 82,24 % para la resistencia a isoniazida. Nuestros resultados demostraron una correlación similar entre la resistencia fenotípica a rifampicina e isoniazida y las mutaciones encontradas en los genes rpoβ (91,6 %) y katG (90,3 %) en cepas ecuatorianas de *M. tuberculosis*<sup>23,46,47</sup>.

## **Recomendaciones**

Este estudio nos provee datos valiosos, incrementa nuestro entendimiento de los mecanismos moleculares de la resistencia a drogas y orienta respecto al uso de las técnicas de susceptibilidad a drogas, basadas en la detección de diferentes tipos de mutaciones que ocurren en las cepas ecuatorianas de *M. tuberculosis*. Sin embargo, no se puede descartar que cepas que no posean estas mutaciones sean resistentes a estos fármacos, con esta consideración se debe realizar una investigación de otros genes causantes de resistencia a estos y a otros fármacos, especialmente a los de segunda línea, considerando que en el país desde el año 2010 se han presentado casos XDR (extensivamente drogorresistente).

## **Agradecimiento**

Los ensayos fueron apoyados por el Instituto de Salud Pública de Chile. Damos las gracias al equipo técnico y administrativo del ISP Chile, especialmente a los PHD Jorge Fernández y Pamela Araya y al personal del Laboratorio de Referencia de tuberculosis del Ecuador en el INSPI, a su red a nivel nacional, especialmente a la Dra. Dolores Kuffó MsC, Dra. Herlinda Villamar, Dra. Libia Aveiga y a la PhD Virna Cedeño, revisora del artículo, así como a todo el equipo de Concepto Azul con atención especial a PHD Eric Mialhe por su ayuda y orientación.

## Referencias bibliográficas

1. El Baghdadi J, Grant AV, Sabri A, El Azbaoui S, Zaidi H, Cobat A, Schurr E, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Abel L. Human genetics of tuberculosis. *PatholBiol (Paris)*. 2013. Organización Mundial de la Salud .Datos y Cifras de la Tuberculosis. 2011-2012
3. Huang WC, Chen CH, Huang CC, Wu KM, Chiou CS, Lin CF, Chen JH, Shen GH A. Reduction in Anti-Tuberculosis Drug Resistance after the Implementation of the National "STOP TB" Program in Central Taiwan, 2013.
4. Ereqat S, Nasereddin A, Azmi K, Abdeen Z, Greenblatt CL, Spigelman M, Rastogi N, Bar-Gal GK. Genetic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* in the West Bank, Palestinian Territories. 2012
5. Azar Dokht Khosravia,b, Hamed Goodarzia\*, Seyed Mohammad Alavib. Detection of genomic mutations in *katG*, *inhA* and *rpoB* genes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain 2012.
6. Perpetual Wangui Ndung'u, Samuel Kariuki, Zipporah Ng'ang'a, Gunturu Revathi Resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients in Nairobi 2012.
7. Daley CL, Caminero JA. 2013 Management of multidrug resistant tuberculosis. 2013. Perizzolo PF, Dalla Costa ER, Ribeiro AW, Spies FS, Ribeiro MO, Dias CF, Unis G, Almeida da Silva P, Gomes HM, Suffys PN, Rossetti ML. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Southern Brazil 2012.
9. Field SK, Fisher D, Jarand JM, Cowie RL. New treatment options for multidrug-resistant tuberculosis. *Ther Adv Respir Dis*. 2012
10. WHO Report. Global Tuberculosis Control 2011-2012
11. Ecuador Perfil Población 2011-2012. Index Mundi. 2012
12. [www.who.int/tb/data](http://www.who.int/tb/data). Report
13. Instituto Nacional de Higiene Laboratorios de la Red de Tuberculosis. 2012
14. Feuerriegel S, Oberhauser B, George AG, Dafaie F, Richter E, Rüscher-Gerdes S, Niemann S Sequence analysis for detection of first-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from a high-incidence setting 2012
15. Iilina EN, Shitikov EA, Ikryannikova LN, Alekseev DG, Kamashev DE, Malakhova MV, Parfenova TV, Afanas'ev MV, Ischenko DS, Bazaleev NA, Smirnova TG, Larionova EE, Chernousova LN, Beletsky AV, Mardanov AV, Ravin NV, Skryabin KG, Govorun VM Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Drug Resistant Strains from Russia. *PLoS One*. 2013.

16. Long Q, Li W, Du Q, Fu Y, Liang Q, Huang H, Xie J. *gyrA/B* fluoroquinolone resistance allele profiles amongst *Mycobacterium tuberculosis* isolates from mainland China 2012.
17. Suzuki Y, Nakajima C, Tamaru A, Kim H, Matsuba T, Saito H. Sensitivities of ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to fluoroquinolones: role of mutant DNA gyrase subunits in drug resistance 2012.
18. Prozorov AA, Zaichikova MV, Danilenko VN. 2012. *Mycobacterium tuberculosis* mutants with multidrug resistance: history of origin, genetic and molecular mechanisms of resistance, and emerging challenges. 2012
19. Gupta A, Prakash P, Singh SK, Anupurba S. 2013 Rapid Genotypic Detection of *rpoB* and *katG* Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Northern India as Determined by MAS-PCR.
20. Indra Bergval, Brian Kwok, Anja Schuitema, Kristin Kremer, Dick van Soolingen, Paul Klatser, Richard Anthony, Pre-Existing Isoniazid Resistance, but Not the Genotype of *Mycobacterium Tuberculosis* Drives Rifampicin Resistance Codon Preference in Vitro 2012.
21. Dantes R, Metcalfe J, Kim E, Kato-Maeda M, Hopewell PC, Kawamura M, Nahid P, Cattamanchi A Impact of isoniazid resistance-conferring mutations on the clinical presentation of isoniazid monoresistant tuberculosis. 2012.
22. Belay Tessema, Joerg Beer, Frank Emmrich, Ulrich Sack, Arne C Rodloff. Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia 2012.
23. Romay Z, Arráiz N, Fuenmayor A, Ramírez C, Rojas L, París R. Detection of S315T mutation in the *katG* gene as a strategy for identification of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. 2012.
24. Pang Y, Liu G, Wang Y, Zheng S, Zhao YL Combining COLD-PCR and high-resolution melt analysis for rapid detection of low-level, rifampin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*. 2013
25. Ahmad S, Al-Mutairi NM, Mokaddas E Variations in the occurrence of specific *rpoB* mutations in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients of different ethnic groups in Kuwait. 2012
26. Pang Y, Lu J, Wang Y, Song Y, Wang S, Zhao Y. Study of the rifampin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis* 2013.
27. Minh NN, Van Bac N, Son NT, Lien VT, Ha CH, Cuong NH, Mai CT, Le TH 2012 Molecular characteristics of rifampin- and isoniazid-resistant *mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Vietnam. 2012
28. Tang K, Sun H, Zhao Y, Guo J, Zhang C, Feng Q, He Y, Luo M, Li Y, Sun Q. Characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Sichuan in China. 2013

29. Tripathi RP, Bisht SS, Ajay A, Sharma A, Misra M, Gupt MP. Developments in chemical approaches to treat tuberculosis in the last decade. 2012
30. P Tahmasebi,\* P Farnia, FM Sheikholslami, and AA Velayati. Rapid identification of extensively and extremely drug resistant tuberculosis from multidrug resistant strains; using PCR-RFLP and PCR-SSCP. 2012.
31. Organización Panamericana de la Salud 2008 Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte II Cultivo Normas y Guía técnica 2008.
32. Jun Li, Jiaojiao Xin, Liyuan Zhang, Longyan Jiang, Hongcui Cao, Lanjuan Li Rapid Detection of rpoB Mutations in Rifampin Resistant M. tuberculosis from Sputum Samples by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 2012.
33. Madania A, Habous M, Zarzour H, GhouryI, Hebbo B. Characterization of mutations causing rifampicin and isoniazida resistance of Mycobacterium tuberculosis in Syria 2012.
34. Smith SE, Kurbatova EV, Cavanaugh JS, Cegielski JP. Global isoniazid resistance patterns in rifampin-resistant and rifampin-susceptible tuberculosis. 2012.
35. Lawn SD, Mwaba P, Bates M, Piatek A, Alexander H, Marais BJ, Cuevas LE, McHugh TD, Zijenah L, Kapata N, Abubakar I, McNERney R, Hoelscher M, Memish ZA, Migliori GB, Kim P, Maeurer M, Schito M, Zumla A. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. Lancet Infect Dis. 2013.
36. Therese KL, Gayathri R, Balasubramanian S, Natrajan S, Madhavan HN Phenotypic and genotypic characteristics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from pediatric population of Chennai, India. Indian J Med Microbiol. 2012.
37. Araya Pamela, Velasco Maritza, Tognarelli Javier, Arias Fabiola, Leiva Tamara, Scapatticio Angélica, Alviz Pablo, Fernández Jorge. Detección de mutaciones asociadas a cepas multidrogosresistente de Mycobacterium tuberculosis en Chile 2011.
38. Rahmo A, Hamdar Z, Kasaa I, Dabboussi F, Hamze M Genotypic detection of rifampicin- resistant M. tuberculosis strains in Syrian and Lebanese patients 2012.
39. Kalokhe AS, Shafiq M, Lee JC, Ray SM, Wang YF, Metchock B, Anderson AM, Nguyen ML. Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing 2013.
40. Adikaram CP, Perera J, Wijesundera SS Geographical profile of rpoB gene mutations in rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Sri Lanka 2012.



41. Yadav R, Sethi S, Dhatwalia SK, Gupta D, Mewara A, Sharma M. Int J Tuberc Lung Dis. Molecular characterisation of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from North India. 2013
42. Jnawali HN, Hwang SC, Park YK, Kim H, Lee YS, Chung GT, Choe KH, Ryoo S. Characterization of mutations in multi- and extensive drug resistance among strains of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Republic of Korea 2013
43. Machado D, Perdigão J, Ramos J, Couto I, Portugal I, Ritter C, Boettger EC, Viveiros M. High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis of the Lisboa family is associated with inhA double mutations 2013.
44. Calgin MK, Sahin F, Turegun B, Gerceker D, Atasever M, Koksall D, Karasartova D, Kiyani M. Expression analysis of efflux pump genes among drug-susceptible and multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates and reference strains. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013
45. Kurbatova EV, Cavanaugh JS, Shah NS, Wright A, Kim H, Metchock B, Van Deun A, Barrera L, Boulahbal F, Richter E, Martín-Casabona N, Arias F, Zemanova I, Drobniewski F, Santos Silva A, Coulter C, Lumb R, Cegielski. Rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis: susceptibility to isoniazid and other anti-tuberculosis drugs 2012.
46. Folkvardsen DB, Svensson E, Thomsen VO, Rasmussen EM, Bang D, Werngren J, Hoffner S, Hillemann D, Rigouts L. Can molecular methods detect 1 % isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis? 2013.
47. Madania A, Habous M, Zarzour H, Ghoury I, Hebbo B. Characterization of mutations causing rifampicin and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis in Syria. 2012.
48. <http://www.who.int/topics/tuberculosis/es/49>. <http://www.who.int/tb/strategy/end-tb/es/50>. Cayci YT, Bilgin K, Coban AY, Birinci A, Durupinar B. An evaluation of false-positive rifampicin resistance on the Xpert MTB/RIF 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29091135>
51. Procedimientos para la prevención y control de la tuberculosis Manual 2017 MSP Ecuador.

E-mail: gretfra@gmail.com gfranco@inspi.gob.ec