Revista científica digital **INSPILIP**

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.104

Artículo Original

Análisis genético de la resistencia a isoniacida en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Genetic analysis of isoniazid resistance in strains of Mycobacterium tuberculosis

***Nicola-Salas Eva*[1], *, *Morey-León Gabriel*[2], *Villacís-Alvarado Ninoska*[1], *Sánchez-Chóez Javier*[1]**

1. *Centro de Referencia Nacional de Micobacterias. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Leopoldo Izquieta Pérez. Julián Coronel, 905 y Esmeraldas, Guayaquil 090514, Ecuador.*
2. *Carrera de Obstetricia. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Guayaquil, Ciudadela Universitaria, avenida Kennedy y avenida Delta. Guayaquil 090514, Ecuador.*

****Autor de correspondencia***
Eva Nicola-Salas. Centro de Referencia Nacional de Micobacterias. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Leopoldo Izquieta Pérez. E-mail: enicola@inspi.gob.ec

Conflicto de interés
Los autores del presente manuscrito declaran no tener conflicto de interés.

Acceso abierto

Citación
Eva Nicola S. Análisis genético de la resistencia a isoniacida en cepas de *Mycobacterium tuberculosis.* Revista científica INSPILIP V. (2), Número 2, Guayaquil, Ecuador.

Correspondencia

Eva Nicola Salas
enicola@inspi.gob.ec

Artículo recibido: 27/08/2018
Artículo aprobado: 26/12/2018
Artículo publicado: 27/12/2018

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.

Resumen

Objetivo: Analizar genéticamente la resistencia a Isoniacida en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-RFLP de la región S315T del gen *katG.*

Materiales y métodos: El estudio se realizó a partir de cultivos positivos de *Mycobacterium tuberculosis* receptados en el Centro de Referencia Nacional de Micobacterias, durante el período 2013 – 2014. El ADN extraído fue cuantificado y evaluada su pureza, por espectrofotometría. Para determinar el polimorfismo en la región 315 del gen *katG* a partir de un producto de amplificación de 630 pb se realizó digestiones con las enzimas de restricción *Msp*I y *SatI*.

Resultados: Del total de 498 cepas analizadas, 215 cepas presentaron características fenotípicas de resistencia a isoniacida (32,6 % monorresistencia, 19,5 % MDR y 47,9 % polirresistencia), 283 cepas eran sensibles. 251 cepas correspondieron a pacientes vírgenes al tratamiento (VT); 174 fueron pacientes antes tratados (AT) y 73 fueron pacientes se encontraban con tratamiento (CT). La mayoría de los casos provenía de la provincia del Guayas (77,2%)

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

La PCR-RFLP-*SatI* presentó alto porcentaje de sensibilidad (98,6 %) y especificidad (98,2 %), mientras que con la enzima *MspI* el porcentaje de sensibilidad fue 88,8 % y 7,4 % de especificidad.

Conclusión: La PCR-RFLP-*SatI* demostró ser específica y económica para la detección de resistencia a isoniacida, proporcionando resultados de forma rápida, la aplicación de esta técnica como apoyo para el diagnóstico permitiría al paciente acceder a un tratamiento más oportuno.

Palabras claves: *Mycobacterium tuberculosis*, catalasa, isoniacida, digestión enzimática.

Abstract

Objective: Genetically analyze the Isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* cultures by PCR-RFLP of the S315T region of the *katG*.

Materials and methods: The study was carried out in positive cultures of *Mycobacterium tuberculosis*, received at the National Reference Center of Mycobacteria, during the period 2013-2014. The DNA extracted was quantified and its purity was evaluated by spectrophotometry. To determine the polymorphism in the 315 region of the *katG* gene, digestions were made with the restriction enzymes *MspI* and *SatI* from a 630 bp amplification product.

Results: Of 498 culture strains analyzed, 215 strains showed phenotypic characteristics of resistance to Isoniazid (32,6 % monoresistance, 19,5 % MDR and 47,9 % polyresistance) and 283 strains were sensitive. 251 strains corresponded to virgin patients to treatment (VT); 174 were patients before treated (AT) and 73 were patients treated (CT). The majority of cases came from the province of Guayas (77,2 %). The PCR-RFLP- *SatI* presented a high percentage of sensitivity (98,6 %) and specificity (98,2 %), while with the *MspI* enzyme the sensitivity percentage was

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

88,8 % and 7,4 % specificity.

Conclusion: The PCR-RFLP-*SatI* proved to be specific and economical for the detection of resistance to isoniazid, providing results quickly, the application of this technique as a support for the diagnosis would allow the patient to access a more timely treatment.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, catalase, isoniazid, enzymatic digestion.

Introducción

La tuberculosis (TB) sigue siendo un gran problema de salud a nivel global, es una de las principales causas de muerte. En 2016, la Organización Mundial de la Salud estimó que hubo 10,4 millones de casos de TB, de las cuales 1,8 millones de personas fallecieron, existiendo el porcentaje mayor de muertes por tuberculosis (95 %) en países de ingresos bajos y medianos[1]. En Ecuador durante el año 2016 se estimó existieron 8.200 casos nuevos de TB (50 casos por cada 100 mil habitantes) y en 2015 se reportó 4,6 % de TB- MDR[2].

Esta enfermedad infecciosa es curable, sin embargo, su control se dificulta debido a la circulación de cepas resistentes a los fármacos del tratamiento, esto como consecuencia directa de tratamientos terapéuticos no adecuados y poca adherencia al mismo, o por la transmisión directa de las cepas resistentes con mutaciones que circulan en la población, estas pueden darse de manera espontánea en el ADN, o inducida por presión de selección, modificando la estructura de la proteína objetivo, lo que provoca que el fármaco no tenga efectos sobre ella[3-5].

La isoniacida junto a rifampicina son los medicamentos de primera línea más eficaces frente a una infección por *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo, existen varias mutaciones específicas a las que se les atribuye la expresión fenotípica de resistencia. La isoniacida, una vez captada por el bacilo como prodroga, es activada por

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

el sistema catalasa-peroxidasa, interfiriendo con la biosíntesis de los ácidos micólicos de la pared celular de las micobacterias[6].

Diversos estudios muestran que la resistencia a isoniacida está vinculada con la existencia de mutaciones específicas en varios genes de *Mycobacterium tuberculosis*, tales como *katG, ahpC, nhd, kasA, oxyR, furA, fabG1*[7-16]. Así también que la aplicación de la técnica RFLP para detección de genes de resistencia a isoniacida utilizando enzimas de restricción brinda resultados rápidos y confiables, con alto porcentaje de especificidad y sensibilidad comparado con métodos convencionales, permitiendo su aplicación en el tamizaje de la enfermedad[17-20]. Basado en la aplicabilidad de la PCR-RFLP para la identificación de la mutación S315T presente en cepas resistentes a isoniacida, esta investigación plantea analizar genotípicamente cepas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la identificación de perfiles de restricción del codón 315 del gen *katG*.

Materiales y métodos

El estudio se realizó a partir de cultivos positivos de *Mycobacterium tuberculosis* receptados en el Centro de Referencia Nacional de Micobacterias, durante el período 2013 – 2014, caracterizados fenotípicamente, mediante pruebas bioquímicas de tipificación y susceptibilidad a drogas antituberculosas (isoniacida (H), rifampicina (R), estreptomicina (S), etambutol (E) y pirazinamida (Z)) por el método de las proporciones Canetti, Rist & Grosset[21]. Los cultivos fueron inactivados a 80°C por 30 min y almacenados a -20°C en el laboratorio de Biología Molecular. Se verificó la información clínica del material inactivo utilizando el Sistema de datos Zinexta.

Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó empleando el kit *Illustra bacteria genomic Prep Mini Spin (GE, Healthcare Life Science)* de

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

acuerdo con las indicaciones del proveedor. El ADN fue eluido en un volumen final de 200 µL, cuantificado y evaluado su pureza por Espectrofotometría a 260 nm y 280 nm utilizando espectrofotómetro *Biophotometer plus (Eppendorf, Hauppauge, NY).*

Amplificación del gen *katG*

Para la amplificación de la región 315 del gen *katG* (630 pb) se utilizó un juego de iniciadores modificados[8] los cuales reconocen una región circundante del codón 315 *katG*904: 5-AGCTCGTATGGCACCGGAAC-3 y *katG*1533rUT2: 5-CGTCGGGGTCGTTGACCTCCCA -3. La reacción de amplificación fue realizada en un volumen final de 50 µL conteniendo 1X de *GoTaq Colorless Master Mix,* 3mM $MgCl_2$ (Promega, Madison, USA), 0,25 µM de cada iniciador (*IDT DNA Technologies, Coraville, USA*) y 1µL de ADN extraído. La amplificación se realizó en un termociclador C1000 *(Biorad Laboratories, CA, USA*) bajo las siguientes condiciones: 94°C por 4 min, 40 ciclos a 94°C por 45 s, 65°C por 45 s, 72°C por 1 min y 72°C por 5 min.

10 µL de cada producto de PCR fue separado en gel de agarosa al 2% con *SYBR safe* a 100 voltios por 45 min, se utilizó 10 µL de marcador de peso molecular de 100 pb (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA*) para verificar los tamaños correspondientes de los productos. Los resultados de PCR fueron digitalizados en un fotodocumentador de geles *Molecular imager Gel Doc* ^{TM} *XR (Biorad Laboratories, CA, USA).*

PCR- RFLP del gen *katG*

Los productos amplificados fueron digeridos con las enzimas de restricción *Mspl* y *Satl* acorde a Leung *et. al* [9]. Se trabajó en reacciones con un volumen final 20 µL conteniendo por separado, 3.0 U de enzima *MspI* (Promega, *Madison, USA),* 1X del Buffer 10X, 2 µg de BSA acetilado; 2U de la enzima *Satl (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA),* 1X Buffer Anza ^{TM} siguiendo las indicaciones del proveedor, e

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

incubadas a 37 C por 4 horas. Los productos digeridos fueron separados en gel de agarosa al 3 % a 100 voltios por 3 horas, los perfiles de digestión obtenidos fueron digitalizados en el fotodocumentador de geles *Molecular imager Gel Doc* ^{TM} *XR (Biorad Laboratories, CA, USA).*

Análisis estadístico

La comparación entre los resultados obtenidos de los aislados sensibles y resistentes fue realizada empleando *OpenEpi (Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health,* Version 3.0.1. www.OpenEpi.com, *updated* 2013/04/06). Los resultados de resistencia genotípica (PCR-RFLP) fueron comparados con el método de las proporciones (regla de oro). La concordancia entre los resultados del método de las proporciones y los métodos moleculares fue evaluada utilizando el coeficiente Kappa (κ). Los valores de concordancia kappa fueron clasificados como débil (≤0.40), moderada (0.41–0.60), fuerte (0.61–0.80) y excelente (>0.80).

Resultados

De las 498 cepas evaluadas, 215 presentaron resistencia a isoniacida (70 monorresistentes, 42 multidrogorresistentes MDR y 103 polirresistentes) y 283 sensibles de acuerdo con la prueba fenotípica de las proporciones, con edad promedio de pacientes de 42,7 ± 14,32 años. Analizando la información epidemiológica, 251 casos correspondían a pacientes sin tratamiento previo (VT), 174 a pacientes con tratamiento previo (AT), 73 pacientes en tratamiento (CT) (tabla 1). Mayoritariamente los pacientes provenían de la provincia del Guayas (368/498), seguido de Machala (26/498), Quito (17/498), Esmeraldas (9/498), Babahoyo (8/498) y Nueva Loja (8/498). 38/498 casos correspondieron a pacientes privados de libertad y 81/498 casos eran de pacientes con VIH.

De los 215 casos con resistencia el 30,23 % correspondía a mujeres (42,27 ± 14,38 años) y 69,76 % a hombres (42,15 ± 14,35 años).

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

Los casos resistentes fenotípicamente, en su mayoría, eran de pacientes que habían recibido un tratamiento previo (44,65 %), seguido de las pacientes sin antecedentes de tratamiento (34,88 %) (tabla 2). 36 casos de pacientes con VIH presentaron resistencia a isoniacida, de las cuales 9 fueron monorresistentes, 9 multidrogorresistentes (MDR) y 18 polirresistentes.

Tabla 1. Distribución de los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo con el tipo de tratamiento y sexo del paciente

Fenotipo	Tratamiento	Mujeres	Hombres
Resistentes	VT	18	57
	AT	28	68
	CT	19	25
Sensibles	VT	53	123
	AT	15	63
	CT	11	18

VT: Sin tratamiento previo; AT: Tratamiento previo; CT: en tratamiento

Se determinó que 43,57 % y 90,96 % de la totalidad de los aislados presentó el codón mutado en la posición S315T al emplear las enzimas *SatI* y *MspI*; mientras que 56,43 % y 9,03 % no presentaron la mutación con *SatI* y *MspI*.

Los aislados resistentes presentaron mejor patrón de mutación (98,6 %) con la enzima *SatI* concordando con el método de las proporciones, mientras en los sensibles el 1,77 % presentó el patrón de mutación con la misma enzima (tabla 3).

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

Tabla 2. Distribución de los aislados de acuerdo a sus patrones de resistencia y correlación con el tipo de tratamiento

Cepas resistentes	n	Tratamiento		
		VT	AT	CT
Monorresistencia				
H	70	36	27	7
Multidrogorresistencia				
H-R	42	18	14	10
Polirresistencia				
H-S	23	5	12	5
H-Z		-	1	-
H-R-E	50	-	2	-
H-R-S		8	17	9
H-R-Z		3	7	3
H-S-E		-	-	1
H-R-S-E	30	4	3	4
H-R-S-Z		-	5	4
H-S-E-Z		-	1	-
H-R-S-E-Z		-	7	2

VT: Sin tratamiento previo; AT: Tratamiento previo; CT: en tratamiento. H: Isoniacida; R: Rifampicina; E: Etambutol; S: Estreptomicina; Z: Pirazinamida. N: número de cepas

Para determinar la confiabilidad de la PCR-RFLP en comparación con el método de las proporciones (prueba de referencia) se determinó el nivel de sensibilidad, especificidad y concordancia entre ambos ensayos. Se obtuvo 98,6 %, 98,2 % y 88,8 %, 7,4 % de sensibilidad y especificidad con *SatI* y *MspI*, respectivamente, para la detección de la resistencia a isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis.* Además, al

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

utilizar la enzima *SatI*, se obtuvieron mejores valores predictivos positivo y negativo, adicionalmente se observó un mejor valor de Kappa de Cohen´s, evidenciando excelente concordancia de resultados (tabla 4).

Tabla 3. Análisis comparativo de la resistencia a isoniacida en aislados de *Mycobacterium tuberculosis*, mediante métodos genotípicos y fenotípicos.

		Métodos fenotípicos y genotípicos	
N° de aislados (%)	**Método de las Proporciones**	**PCR-RFLP**	
		***MspI* (*n;* %)**	***SatI* (*n;* %)**
215 (43,17)	R	R (191/215; 88,83)	R (212/215; 98,60)
	R	S (24/215; 11,16)	S (5/215; 2,33)
	S	R (262/283; 92,58)	R (5/283; 1,77)
283 (56,83)	S	S (21/283; 7,42)	S (278/283; 98,23)

R, resistente; S, sensible.

Discusión

La detección oportuna de la resistencia a drogas es primordial para combatir la creciente prevalencia de tuberculosis resistente a drogas. En los últimos años ha incrementado los estudios al respecto, lo que ha permitido el desarrollo de nuevos y mejores métodos diagnósticos fenotípicos y genotípicos[23] con el propósito de brindar al paciente una detección rápida y específica de la resistencia a medicamentos.

En nuestro estudio se evidenció que la PCR-RFLP es altamente reproducible para el diagnóstico de la resistencia a isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo, su especificidad dependería de la enzima que se emplee y la región estudiada. Resultados similares[8, 17, 24] muestran que la enzima *MspI* detecta únicamente la sustitución AGC→ACC, mientras que *SatI* puede

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

detectar las sustituciones adicionales que se presentan en el codón 315 (AGC→ACC, ACG, ACA, ACT).

Tabla 4. Parámetros estadístico descriptivo de la PCR-RFLP-*MspI* y PCR-RFLP-*SatI* en relación con el 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 *MspI* (*n* =500, 95% IC)**	**PCR-RFLP *SatI* (*n* =500, 95% IC)**
Sensibilidad (%)	88,84 (83,93 - 92,38)	98,6 (95,98 - 99,52)
Especificidad (%)	7,42 (4,904 - 11,08)	98,23 (95,93 - 99,24)
Valor predictivo positivo (%)	42,16 (37,7 - 46,76)	97,7 (94,72 - 99,01)
Valor predictivo negativo (%)	46,67 (32,93 - 60,92)	98,93 (96,91 - 99,64)
Precisión diagnóstica (%)	42,57 (38,3 - 46,95)	98, 39 (96,86 - 99,18)
Razón probabilística positiva	0,9596	55,81
Razón probabilística negativa	1,504	0,0142
Kappa de Cohen´s	-0,033	0,9673

Se conoce que la resistencia a fármacos se produce principalmente como consecuencia directa de tratamientos terapéuticos no adecuados, poca adherencia al mismo o por la transmisión directa de las cepas resistentes con mutaciones que circulen en la población[25- 27], en nuestro estudio se observó que 79,54 % de las muestras que presentaron la mutación en el codón 315 correspondió a pacientes con tratamiento previo (44,65 %) y sin tratamiento previo (34,88 %), esto sugiere una posible baja adherencia al esquema de tratamiento o calidad del medicamento, lo que habría generado cepas resistentes a esta droga, adicionalmente, que existan pacientes sin

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

tratamiento previo (VT) infectados con cepas que presenten la mutación S315T sugeriría la circulación dentro de la población de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la isoniacida, lo que haría poco eficiente el tratamiento brindado al paciente. Las mutaciones presentes en otros genes contribuyen al desarrollo de la resistencia a isoniacida en micobacterias[7-16], siendo necesario realizar estudios que incluyan otros genes relacionados a la resistencia, permitiendo mejorar la identificación de mutaciones presentes en los linajes de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes en el Ecuador.

Conclusiones

La isoniacida es uno de los medicamentos más importante y eficaz en el control de la infección tuberculosa, tiene una baja tasa de efectos adversos y no puede aún ser sustituido por otra alternativa igualmente efectiva[28], lo cual la convierte en un aliado idóneo en el control de la enfermedad. Las mutaciones en el gen *katG* en *Mycobacterium tuberculosis*, principalmente la S315T, están asociada con una amplia gama de resistencia a isoniacida de nivel moderado a alto, sobre las concentraciones habitualmente evaluadas, lo cual estaría influyendo en su efectividad dentro de la terapia antituberculosa, por lo que la identificación de mutaciones circulantes en el país sería primordial. Este estudio permitió evidenciar que la PCR-RFLP-*SatI* para la detección de mutación S315T del gen *katG* es específica y económica para la detección de resistencia a isoniacida, obteniendo un resultado rápido que permita brindar el tratamiento oportuno y específico al paciente.

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

Bibliografía

1. Organización Panamericana de Salud – WHO. 2017. Global Tuberculosis Report. Geneva, Switzerland; WHO press 2018. [consultado 10 Jun 2018]. Disponible en http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

2. Ministerio de Salud Pública de Ecuador. 2018. Prevención, diagnóstico, tratamiento y control de la tuberculosis. Guía práctica clínica. Segunda edición. Disponible en https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2018/03/GP_Tuberculosis-1.pdf

3. Caminero J. Guía de tuberculosis para médicos especialistas Paris: Compogravure; 2003.

4. CDC. Center for Disease Control and Prevention / National Center for HIV/AIDS, viral hepatitis, STD and TB prevention. 2014. Dpto. de salud y servicios humanos de EE. UU.

5. Arraiz N, Bermúdez V, Urdaneta B. 2005. Resistencia a drogas en *M. tuberculosis:* Bases moleculares. Farmacología y Terapéutica. Vol. 24, núm. 1.

6. Rossetti MLR, Valim ARDM, Silva MSN, Rodrigues VS. (2002). Resistant tuberculosis: a molecular review. Revista de Saúde Pública. 2002; 36(4): 525-32.

7. Zolay Romay, Nailet Arráiz, Alisbet Fuenmayor, Carmen Ramírez, Luis Rojas y Rafael París. 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. chil. infectol. vol.29 no.6 Santiago dic. 2012

8. Herrera-León L., Molina T., Saíz P., Sáez-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.

9. Leung E.T.Y., Kam K., M,Chiu., *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.

10. Ramaswamy, S. V., Reich, R., Dou, S. J., et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis.* Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003; 47(4): 1241-50.

11. Ajbani, K., Lin, S. Y. G., Rodrigues, C., et al. Evaluation of pyrosequencing for detecting extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among clinical isolates from four high-burden countries. Antimicrobial

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

agents and chemotherapy. 2015; 59(1): 414-20.

12. Mac Aogáin M, Bower JE, Basu I, Freeman JT, O'Toole RF. Draft genome sequence of a drug-susceptible New Zealand isolate of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 3. Genome announcements. 2005;3(3): e00499-15.

13. Salamon H, Yamaguchi KD, Cirillo DM, et al. Integration of published information into a resistance-associated mutation database for *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Infectious Diseases. 2015; 211(suppl 2): S50-7.

14. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. PLoS one. 2015; 10(3): e0119628. doi:10.1371/journal.pone.0119628.

15. Cabal A, Strunk M, Domínguez J, et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis used for the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on a pyrosequencing assay. BMC microbiology. 2014; 14(1): 21.

16. Rodwell TC, Valafar F, Douglas J, et al. Predicting extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* phenotypes with genetic mutations. Journal of clinical microbiology. 2014; 52(3): 781-9.

17. Sánchez-Domínguez, J., Nicola-Salas, E., & Morey-León, G. (2018). Determinación de la mutación S315T del gen katG en aislados resistentes a isoniacida de *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-RFLP. Infectio, 22(4), 178-184.

18. Bornasi, H., Arjomandzadegan, M., Bahrmand, A., Tasbiti, A. H., Ahmadi, A., & Tayeboon, M. (2015). Comparison of PCR-RFLP and Allele Specific-PCR and sequencing in rapid diagnosis of isoniazid resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Tibb-i junub, 18(2), 296-303.

19. Riaz, M., Mahmood, Z., Javed, M. T., Javed, I., Shahid, M., Abbas, M., & Ehtisham- ul-Haque, S. (2016). Drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified through PCR-RFLP from patients of Central Punjab, Pakistan. International journal of immunopathology and pharmacology, 29(3), 443-449.

20. Ravibalan, T., Samrot, A. V., Maruthai, K., Kommoju, V., Kesavan, S., & Muthaiah,

M. (2015). Evaluation of multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of katG (S315T) gene mutation in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Puducherry, South India. J Pure Appl Microbiol, 9, 2339-45.

Código ISSN 2588-0551
DOI: 10.31790/inspilip.v2i2.60.g64

21. Canetti G, Rist N, Grosset JM. 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.

22. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEPI: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, version. www.OpenEpi.com, actualizado 2013/04/06, accedido 2018/08/24.

23. Gupta A, Anupurba S. Detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Methods, principles and applications. Indian Journal of Tuberculosis. 2015; 62(1): 13- 22.

24. Mathuria JP, Nath G, Samaria JK, Anupurba S. Molecular characterization of INH- resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by PCR-RFLP and multiplex-PCR in North India. Infection, Genetics and Evolution. 2009; 9(6): 1352-5.

25. Palomino, J. C., & Martin, A. (2014). Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. Antibiotics, 3(3), 317-340.

26. World Health Organization. Drug resistance tuberculosis. [consultado 24 Aug 2018]. Disponible en http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/en/

27. Hoagland, D. T., Liu, J., Lee, R. B., & Lee, R. E. (2016). New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Advanced drug delivery reviews, 102, 55-72.

28. Stagg HR, Lipman MC,McHugh TD,and Jenkins HE. (2017) Isoniazid resistant tuberculosis- a cause for concern? Int. J. Tuberc Lung Dis. 21(2):129-39. doi:10.5588/ijtld.16.0716.