

ARTÍCULO ORIGINAL

GenoType MTBDRplus 1.0® para la detección de resistencia cruzada entre isoniacida y etionamida en aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes

Johana Rueda^{1,2}, Teresa Realpe^{1,2}, Gloria Mejía¹, Elsa Zapata¹, Jaime Robledo^{1,2}

¹ Unidad de Bacteriología y Micobacterias, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

² Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

Introducción. Una parte de los aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente también presenta resistencia a la etionamida. Es importante determinar si la resistencia a la isoniacida es independiente o se cruza con la resistencia a la etionamida, ya que si sucede lo segundo habría que reevaluar el tratamiento antituberculoso de segunda línea. La prueba molecular GenoType MTBDRplus® detecta las mutaciones asociadas con la resistencia a isoniacida y podría detectar la resistencia cruzada a la etionamida.

Objetivo. Evaluar la prueba GenoType MTBDRplus® y comparar su desempeño con el de la secuenciación, en la detección de mutaciones en el gen *katG* y en el promotor *inhA* en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* multirresistente.

Materiales y métodos. Se utilizaron el estuche comercial GenoType MTBDRplus 1.0® y la secuenciación para evaluar mutaciones en el gen *katG* y en el promotor *inhA* en 30 aislamientos de *M. tuberculosis* multirresistente con resistencia a la etionamida. La cepa de laboratorio H37Rv y tres aislamientos sensibles a los medicamentos de primera línea, sirvieron de control.

Resultados. Al comparar los resultados de la secuenciación y de la prueba GenoType MTBDRplus®, el índice kappa fue de 1. Todos los aislamientos resistentes a la isoniacida y la etionamida tenían las mutaciones detectadas con la prueba GenoType MTBDRplus® en el gen *katG*, y 40 % de ellos, las detectadas en el promotor *inhA*. Mediante secuenciación se encontraron, además, mutaciones en *katG* en posiciones diferentes a las detectadas por la prueba GenoType MTBDRplus®.

Conclusión. La prueba GenoType MTBDRplus® tiene la capacidad de detectar rápidamente la resistencia a isoniacida. Además, los resultados del estudio sugieren que también podría utilizarse como prueba de tamización para detectar la resistencia cruzada a etionamida.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis resistente a múltiples medicamentos, etionamida, isoniacida, análisis de secuencia, mutación.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i4.2813>

GenoType MTBDRplus 1.0® for the detection of cross-resistance between isoniazide and ethionamide in isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

Introduction: A variable proportion of isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* also presents resistance to ethionamide. It is important to determine whether resistance to isoniazid is independent or crossed with resistance to ethionamide, given that this could lead to the re-evaluation of second-line anti-tuberculosis treatment. The GenoType MTBDRplus® molecular test is used for the detection of MDR-MTB, as it identifies mutations associated with resistance to isoniazide and could detect cross-resistance with ethionamide.

Objective: To evaluate the performance of GenoType MTBDRplus® in comparison with sequencing in the detection of mutations in gene *katG* and promotor *inhA* in clinical isolates of multidrug-resistant *M. tuberculosis*.

Materials and methods: The GenoType MTBDRplus 1.0® commercial kit and sequencing were used to evaluate mutations in gene *katG* and promotor *inhA* in 30 multidrug-resistant *M. tuberculosis* isolates that were resistant to ethionamide. The laboratory strain H37Rv and three pan-sensitive isolates acted as controls.

Contribución de los autores:

Johana Rueda: ejecución del proyecto, análisis e interpretación de los datos y redacción del manuscrito

Teresa Realpe: análisis e interpretación de los datos

Gloria Mejía y Elsa Zapata: aplicación de la metodología

Jaime Robledo: diseño y gestión del proyecto

Todos los autores participaron en la asesoría, la revisión y la aprobación del artículo.

Results: The kappa index for the comparison between the results of sequencing and GenoType MTBDR*plus*[®] was 1. All the isolates resistant to isoniazid and ethionamide had the mutations detected by GenoTypeMTBDR*plus*[®] in the *katG* gene and 40% of them in promotor *inhA*. Sequencing also revealed *katG* mutations in positions different to those detected by GenoType MTBDR*plus*[®].

Conclusion: GenoType MTBDR*plus*[®] is able to detect resistance to isoniazid rapidly. Our results suggest that it could also be used to screen for cross-resistance with ethionamide.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis, multidrug-resistant; ethionamide, isoniazid, sequence analysis, mutation.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i4.2813>

El tratamiento que actualmente se recomienda para los casos nuevos de tuberculosis sensible consta de cuatro medicamentos de primera línea: isoniácida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, de los cuales los dos primeros son los medicamentos antituberculosos más potentes (1). En los casos de tuberculosis resistente a estos dos medicamentos, más conocida como tuberculosis multirresistente, se requiere el uso de medicamentos de segunda línea, que son más costosos, generan más efectos adversos e implican un tratamiento más prolongado (1).

En 2013 se estimaba que 3,5 % de los casos nuevos y 20,5 % de los casos previamente tratados en el mundo, correspondían a tuberculosis multirresistente (1). Según estudios efectuados por el Instituto Nacional de Salud, en Colombia, la prevalencia de la tuberculosis multirresistente en 2004 y 2005 fue de 2,38 % en casos nuevos y de 31,44 % en casos previamente tratados (2). Según el Laboratorio Departamental de Salud Pública de Antioquia, hasta 2009 se confirmaba un promedio de 20 pacientes con tuberculosis multirresistente al año en ese departamento. Sin embargo, con la búsqueda activa de casos a partir de 2010, este promedio se elevó a 40 pacientes nuevos por año, lo cual se ha asociado con un incremento en el número de casos de tuberculosis multirresistente reportados y destaca la importancia de la vigilancia epidemiológica en la detección de estos aislamientos en el país (3).

Para la detección de la resistencia a isoniácida y rifampicina, se han implementado diferentes métodos genotípicos que van desde la secuenciación del ADN hasta las pruebas rápidas comerciales

como la GeneXpert[®] (Cepheid, Sunnyvale, California) y la GenoType MTBDR*plus* 1.0[®] (Hain Life Science, Nehren, Alemania). En 2008, la Organización Mundial de la Salud recomendó el uso de esta última metodología para la detección rápida y simultánea del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y su resistencia a isoniácida y rifampicina a partir de cultivos o muestras clínicas pulmonares con baciloscopia positiva (4,5). Esta prueba detecta los niveles altos de resistencia a la isoniácida mediante la localización de mutaciones en el codón 315 del gen *katG*, y los niveles bajos de resistencia mediante la detección de mutaciones en la región promotora del gen *inhA* (6). En la actualidad, existe una nueva versión de la prueba, la GenoType MTBDR*plus* 2.0[®], que puede usarse en muestras con baciloscopia negativa (7).

En estudios previos en diferentes partes del mundo, se han confirmado niveles variables de resistencia cruzada entre la isoniácida y la etionamida debido a que comparten el mismo blanco de acción, la enzima enoil-ACP-reductasa (InhA), que hace parte de la síntesis de los ácidos micólicos de cadena larga de la pared celular de *M. tuberculosis* (8-10). Por lo tanto, se podría esperar que las mutaciones en la región promotora del gen *inhA* detectadas mediante la prueba GenoTypeMTBDR*plus*[®], no solo estén asociadas con bajos niveles de resistencia a la isoniácida, sino también, con la resistencia cruzada a la etionamida, lo cual implicaría eliminar este medicamento de los tratamientos de segunda línea.

Los objetivos del presente estudio fueron: (i) evaluar el desempeño de la prueba GenoType MTBDR*plus* 1.0[®] comparada con la secuenciación para la detección de mutaciones en el gen *katG* y en la región promotora *inhA* en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* multirresistente locales, y (ii) determinar su desempeño para la detección rápida de resistencia cruzada entre isoniácida y etionamida a partir de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* multirresistente.

Correspondencia:

Johana Rueda, Unidad de Bacteriología y Micobacterias, Corporación para Investigaciones Biológicas, Carrera 72A N° 78B-141, Medellín, Colombia

Teléfono: (574) 403 5950, extensión 248; fax: (574) 441 5514
jrueda@cib.org.co

Recibido: 23/04/15; aceptado: 03/07/15

Materiales y métodos

Selección de la muestra

Se hizo un estudio experimental *in vitro*. Se seleccionaron por conveniencia y en diferentes pacientes, 30 aislamientos de *M. tuberculosis* multirresistente con resistencia a etionamida y cuatro aislamientos de *M. tuberculosis* sensibles a todos los medicamentos contra la tuberculosis, incluida la cepa de referencia H37Rv. Estos aislamientos tenían patrones de sensibilidad conocida a medicamentos de primera y segunda línea, establecidos mediante el método de las proporciones múltiples en agar (11) y el método automatizado BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA). Los aislamientos se conservaron en leche descremada (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg/Germany) a -70 °C en la colección de la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la Corporación para Investigaciones Biológicas de Medellín, Colombia. No se hicieron pruebas de genotipificación en los 30 aislamientos de *M. tuberculosis* multirresistente con resistencia a etionamida para determinar si estaban epidemiológicamente relacionados.

Extracción del ADN genómico

Los aislamientos conservados a -70 °C se reconstituyeron primero en medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg/Germany) y luego se 'subcultivaron' en agar Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg/Germany) hasta que presentaron un crecimiento óptimo. Del crecimiento de cada uno de los

aislamientos, se transfirieron dos asadas a un tubo de microcentrífuga que contenía 300 µl de agua destilada y se inactivaron mediante calentamiento a 95 °C durante 20 minutos. Posteriormente, este se incubó durante 15 minutos en un baño sonicador (Coler-Parmer Instrumental Company, USA), y se centrifugó durante cinco minutos a 13.000 rpm y a temperatura ambiente (Sigma 1-14 Microfuge, Newtown, Wem, Shropshire, UK). Se transfirieron 200 µl del sobrenadante que contenía el ADN a un nuevo tubo de microcentrífuga que se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificó la región completa de los genes *katG* y *fabG1*; además, para *fabG1* se amplificaron 200 pb corriente arriba del gen, ya que allí se localiza la región promotora *inhA*. Se utilizaron 10 µl de ADN en una concentración de 10 ng/µl en un volumen final de 50 µl de mezcla que contenía tampón 1X con (NH₄)₂SO₄ (Thermo Scientific Life Science), 1,5 mM de MgCl₂ (Thermo Scientific Life Science), una mezcla de 0,2 mM de dNTP (Invitrogen, CA, USA), 0,2 µM de iniciadores (IDT inc. USA) (cuadro 1) y 2,5 U de ADN polimerasa Taq (Thermo Scientific Life Science). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Thermal Cycler BioRad, Richmond, CA) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 3 minutos a 95 °C seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 57 °C y 2 minutos a 72 °C, y una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para la amplificación mediante PCR y secuenciación del gen *katG* y la región promotora *inhA*

Gen	Iniciador	Secuencia (5'→3')	Aplicación		
			PCR	Secuenciación	
Gen <i>fabG1</i> (744 pb) + promotor <i>inhA</i> (200 pb)	fabGP1F	GAAGATCCGCGTCGATCCACTTG	X	X	
	fabGP2R	GACGTCACATTTCGACGCCAAACAG		X	
	fabGP4R	GATGACCGCACCGGAGATATAGCTC		X	
	fabGP5F	CCAAACCCCATTCGTATCCCG		X	
	fabGP7F	GCAAACGTGACCGGAATGTG		X	
	fabGP8R	GGCCATCGAAGCATAACGAATACGC	X	X	
	Gen <i>katG</i> (2223 pb)	katGP2R	GTCAGGGCGTCAACGTCGATG		X
		katGP3F	GTTATCGCCGATGTCGACTGTGC	X	X
katGP4R		CTCCGGGTTACGTCGACTGATCAGC		X	
katGP5F		GCCCAACCGGCTCAATCTGAAG		X	
katGP6R		CGAACTCGTCGGCCAATTCCTC		X	
katGP7F		GTCTATTGGGGCAAGGAAGCCAC		X	
katGP8R		CACGTCGGTTTGTTCTGCGAC		X	
katGP9F		GATGCTGGCCACTGACCTCTC		X	
katGP10R		CATTTCCGGCGCCCTTTCTCCTC	X	X	
katGP11F		CACAACATCACGGTGCCCTTCAC		X	

Secuenciación y análisis de las secuencias

Las muestras amplificadas se remitieron para su secuenciación mediante el método Sanger (Macrogen Seoul, Republic of Korea). Se utilizó el programa FinchTV, versión 1.4 (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) para observar la calidad del cromatograma y editar las secuencias. Se obtuvieron las secuencias consenso mediante el uso del programa ClonManager Professional Suite, versión.9.0 (Sdi-Ed Software, NC, USA) y, posteriormente, se hizo el alineamiento de nucleótidos con el programa ClustalW, disponible en línea en la página del *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), el cual permite ver los cambios o la homología de la secuencia del ADN.

GenoType MTBDRplus 1.0®

La amplificación, hibridación e interpretación de los resultados del ensayo GenoType MTBDRplus 1.0® (Hain Lifescience, Nehren, Germany), se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante (6). Para la amplificación, se combinaron 35 µl de la mezcla de cebadores y nucleótidos (PNM) con 5 µl de tampón 10X, 2 µl de MgCl₂, 3 µl de agua de grado molecular, 0,2 µl de polimerasa Hot-Start Taq (QIAGEN, Hilden, Alemania) y 5 µl de ADN, para un volumen final de 50,2 µl. La amplificación se hizo en un termociclador (Thermal Cycler BioRad, Richmond, CA), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización durante 5 minutos a 95 °C, seguida por 10 ciclos de 30 segundos a 95 °C y 2 minutos a 58 °C, 20 ciclos de 25 segundos a 95 °C, 40 segundos a 53 °C y 40 segundos a 70 °C, y un ciclo final de 8 minutos a 70 °C.

El proceso de hibridación se hizo en un equipo TwinCubator® (Hain Lifesciences GmbH, Germany). Las tirillas se interpretaron mediante la comparación de las bandas obtenidas con la plantilla de lectura suministrada en el kit. Cualquier desviación del patrón de tipo silvestre detectada en el gen *katG* o en la región promotora *inhA* en los aislamientos, se consideró indicativa de resistencia a la isoniácida.

Análisis de los resultados

Se hizo un análisis descriptivo de la frecuencia de mutaciones en el gen *katG* y en la región promotora *inhA* en los aislamientos evaluados. Se determinó la concordancia entre los resultados de la secuenciación y la prueba comercial GenoType MTBDRplus®, estimando el índice kappa de Cohen.

Para el análisis de la prueba solo se tuvieron en cuenta los resultados de la resistencia a isoniácida (gen *katG* y región promotora *inhA*). Los cálculos se hicieron con el programa Epidat®, versión 3,1 (Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, España y Organización Panamericana de la Salud).

Esta investigación fue aprobada por los comités de ética de la Universidad Pontificia Bolivariana y de la Corporación para Investigaciones Biológicas.

Resultados

El porcentaje de acuerdo entre los resultados de la secuenciación y de la prueba GenoType MTBDRplus® para la detección de mutaciones en *katG* o en la región promotora *inhA*, fue de 100 % (kappa=1). Se detectaron mutaciones en *katG* en 28 aislamientos de *M. tuberculosis* multirresistente con resistencia a etionamida; 27 de ellos tenían la mutación S315T y un aislamiento tenía la mutación S315G, detectada en la prueba comercial por omisión de la banda de tipo silvestre (figura 1). Además de detectar mutaciones en el codón 315, la secuenciación también reveló que dos de estos aislamientos tenían mutaciones dobles en *katG*: S315T/I248M en uno y S315G/R463L en el otro.

La prueba comercial no detectó mutaciones en el gen *katG* en los dos aislamientos restantes. Sin embargo, la secuenciación detectó mutaciones en *katG* en posiciones diferentes a las detectadas por la prueba GenoType MTBDRplus®: W397Y/S652A en un aislamiento y V442G en otro. Además, estos dos aislamientos también tenían mutaciones en la posición -15C→T de la región promotora *inhA*, las cuales fueron detectadas por ambas pruebas.

De los 30 aislamientos de *M. tuberculosis* multirresistente con resistencia a etionamida, 12 (40 %) presentaban mutaciones en la región promotora *inhA*, las cuales fueron detectadas por ambos métodos. Nueve aislamientos presentaron cambios en la posición -15C→T, un aislamiento exhibió una mutación en la posición -8T→C y dos aislamientos tenían mutaciones en la posición -8T→G, detectados en la prueba comercial por omisión de la banda de tipo silvestre 2 (figura 1 y cuadro 2). Ninguno de los aislamientos de *M. tuberculosis* multirresistente con resistencia a etionamida secuenciados, tenía mutaciones en el marco abierto de lectura del gen *fabG1*. Como era de esperarse, no se encontraron mutaciones en los aislamientos fenotípicamente sensibles a isoniácida y etionamida, incluida la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv (cuadro 2).



Figura 1. Representación de los patrones obtenidos para el gen *katG* y región promotora *inhA* por la prueba comercial GenoType® MTBDR*plus* en aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis*. WT: tipo silvestre (*wild type*); MUT: mutada; Δ: ausencia
 Tirilla 1 control negativo; tirilla 2 control positivo para MTB, sensible a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF); tirilla 3 Δ WT y MUT1 (*katG*), tirilla 4 Δ WT (*katG*), Δ WT1 y MUT1 (*inhA*); tirilla 5 Δ WT1 y MUT1 (*inhA*); tirilla 6 Δ WT y MUT1 (*katG*); Δ WT2 y MUT3A (*inhA*); tirilla 7 Δ WT y MUT1 (*katG*), Δ WT2 (*inhA*).

Cuadro 2. Comparación de los resultados de la secuenciación y la prueba GenoType® MTBDR*plus* para la detección de resistencia a isoniacida y etionamida en 34 aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* con resistencia a isoniacida y etionamida y sin esta

Resultados fenotípicos		Número de aislamientos (%)	Resultados de la secuenciación		Prueba comercial GenoType® MTBDR <i>plus</i>	
Isoniacida	Etionamida		Cambio de aminoácido en el gen <i>katG</i> *	Cambio de nucleótido en el promotor <i>inhA</i> †	Cambio de aminoácido en el gen <i>katG</i>	Cambio de nucleótido en el promotor <i>inhA</i>
R	R	17 (56,7)	S315T	WT	ΔWT, MUT1 (S315T)	WT
		1 (3,33)	S315T, I248M ‡	WT	ΔWT, MUT1 (S315T)	WT
		6 (20)	S315T	- 15C→T	ΔWT, MUT1 (S315T)	ΔWT1, MUT1 (C15T)
		2 (6,7)	S315T	- 8T→G	ΔWT, MUT1 (S315T)	ΔWT2
		1 (3,33)	S315T	- 8T→C	ΔWT, MUT1 (S315T)	ΔWT2, MUT3A (T8C)
		1 (3,33)	S315G, R463L ‡	- 15C→T	ΔWT	ΔWT1, MUT1 (C15T)
		1 (3,33)	W397Y ‡, S652A ‡	- 15C→T	WT	ΔWT1, MUT1 (C15T)
		1 (3,33)	V442G ‡	- 15C→T	WT	ΔWT1, MUT1 (C15T)
		4 (100)	S	S	WT	WT

* Posición del cambio de aminoácido (código de una sola letra); † Posición del cambio de la tripleta de nucleótidos; ‡ Mutaciones detectadas por secuenciación y no por GenoType®.

Las mutaciones no descritas en *katG* aparecen subrayadas. S: serina; T: Treonina; V: valina; G: glicina; I: isoleucina; M: metionina; R: arginina; L: leucina; W: triptófano; Y: tirosina; A: alanina. WT: tipo silvestre (*wild type*); MUT: mutada; Δ: ausencia

Discusión

La prueba GenoType MTBDR*plus*® es útil y puede proporcionar resultados en ocho horas, lo que permite un diagnóstico rápido de la tuberculosis multirresistente, y favorece el inicio temprano y específico del tratamiento contra la tuberculosis (12,13). En nuestro estudio hubo una concordancia perfecta (kappa=1) entre los

resultados de la secuenciación y los de la prueba GenoTypeMTBDR*plus*® para la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a isoniacida. En otros estudios se han reportado porcentajes de acuerdo entre 91,3 y 98,1 % al comparar los resultados de la prueba GenoType MTBDR*plus*® con los de la secuenciación del gen *katG* y la región promotora *inhA* (14-16).

Las mutaciones en *katG* son el principal mecanismo de resistencia a la isoniacida, específicamente la mutación en el codón 315, que genera la sustitución del aminoácido serina por treonina y puede variar entre 4 % (17) y 97 %, dependiendo de la región geográfica (18). En este estudio, la presencia de la mutación en el codón 315 se encontró en 93,33 % (28/30) de los aislamientos evaluados. Sin embargo, con la secuenciación se identificaron otras mutaciones en el gen *katG* que no fueron detectadas por la prueba comercial (I248M, W397, S652A y V442G). Tres de estas mutaciones no se han reportado previamente en la literatura científica (cuadro 2), por lo que es importante confirmar los resultados de la prueba GenoType MTBDR*plus*[®] con las pruebas de laboratorio tradicionales.

Además de la mutación S315T, otras mutaciones en el gen *katG* como las D65E, D94A, G99E, H108E, N138S/H, S140A/N, D142A, L150A, S160L, A172T, T180C, F252L, T262R, P275T, W299G, W328G, I335T, A350S, se han asociado con altos niveles de resistencia a isoniacida (19). Sin embargo, sin pruebas fenotípicas de concentración inhibitoria mínima, no puede asegurarse que los dos aislamientos sin mutación en el codón 315 encontrados en este estudio tuvieran bajos niveles de resistencia a isoniacida.

La decisión de incluir o excluir la etionamida del tratamiento de la tuberculosis multirresistente, depende de la frecuencia de las mutaciones en la región promotora *inhA* en una población dada de *M. tuberculosis*. En una reciente revisión sobre la frecuencia de mutaciones a nivel global asociadas con la resistencia a isoniacida, se reportó que 20,5 % de los aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes fenotípicamente a este medicamento tenían mutaciones en el promotor *inhA* (20). En Etiopía se ha detectado que las mutaciones en esta región son poco frecuentes (0,8 %), lo cual habla en favor de su escasa contribución en la aparición de la resistencia a etionamida (21), en tanto que, en Sudáfrica y en Brasil, se han reportado 62,4 % (22) y 94 % (23) de mutaciones en el promotor *inhA* en los aislamientos de *M. tuberculosis* multirresistente. Es decir, que la inclusión de la etionamida en el tratamiento de segunda línea no tendría ningún beneficio y deberían considerarse otras combinaciones terapéuticas. Aunque una de las limitaciones de este estudio fue el muestreo por conveniencia, en 40 % de los casos se encontraron mutaciones en el promotor *inhA*; la mutación más frecuente en nueve de doce aislamientos fue en

la posición -15 del promotor, que causa un cambio de una C→T. Se ha demostrado que esta mutación aumenta la expresión del gen, causando un efecto de titulación en el que se produce suficiente *InhA* blanco como para ser inhibido por la isoniacida y la etionamida sin afectar la síntesis de los ácidos micólicos (24,25).

El uso de la prueba GenoType MTBDR*plus*[®] como tamización para detectar la resistencia cruzada entre isoniacida y etionamida, se vio respaldado por los resultados en los aislamientos evaluados en el estudio. Sin embargo, son necesarios otros estudios dirigidos a determinar cuál es la frecuencia de la resistencia cruzada entre isoniacida y etionamida en el país.

Como se ha evidenciado en otras publicaciones (26,27), los hallazgos del presente estudio confirman que la prueba GenoType MTBDR*plus*[®] tiene la capacidad de detectar rápidamente la resistencia a isoniacida y rifampicina, y sugieren que también puede utilizarse como tamización para detectar la resistencia cruzada entre la isoniacida y la etionamida, ya que 40 % (12/30) de los aislamientos estudiados tenían mutaciones en el promotor *inhA* y fueron resistentes a etionamida en las pruebas de sensibilidad. Un resultado de la prueba GenoType MTBDR*plus*[®] confirmatorio de la presencia de mutaciones en la región promotora *inhA* en aislamientos de *M. tuberculosis* multirresistente, indicaría resistencia cruzada entre isoniacida y etionamida, lo que implicaría no incluirla en el tratamiento de los pacientes con tuberculosis multirresistente. No obstante, se ha descrito la participación de otros genes, como el *ethA*, el *ethR*, el *ndh* y el *mshA* (10,28), que podrían ser responsables de la resistencia a la etionamida en 60 % (18/30) de los aislamientos en los que no se encontraron mutaciones en el promotor *inhA*. Por lo tanto, la utilización de esta prueba para detectar la resistencia a la etionamida estaría limitada al conocimiento previo de la prevalencia de mutaciones en la región promotora *inhA* y en otros genes relacionados con la resistencia a este medicamento en una población determinada.

En conclusión, la aplicación de la prueba GenoType MTBDR*plus*[®] es útil para detectar mutaciones específicas asociadas con la tuberculosis multirresistente y, según la población de que se trate, permitiría establecer de una manera rápida la resistencia cruzada entre isoniacida y etionamida, lo cual es útil para decidir sobre la inclusión o exclusión de la etionamida en los esquemas de

tratamiento de segunda línea. Sin embargo, la ausencia de mutaciones en el promotor *inhA* no garantiza la eficacia del tratamiento con dicho fármaco, porque existen otros genes relacionados con la resistencia a este medicamento.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las instituciones participantes y al Centro de Investigación para el Desarrollo y la Innovación de la Universidad Pontificia Bolivariana por la pasantía en investigación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no haber tenido conflictos de intereses de ningún tipo durante el desarrollo del presente estudio.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el Departamento Administrativo Colombiano de Ciencia, Tecnología e Innovación - Colciencias (código 221356933562).

Referencias

1. **World Health Organization.** Nineteenth global report on tuberculosis. Report Number WHO/HTM/TB/2014.08. Geneva: WHO; 2014.
2. **Garzón MC, Angée DY, Llerena C, Orjuela DL, Victoria JE.** Vigilancia de la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos antituberculosos, Colombia 2004-2005. *Biomédica.* 2008;28:319-26. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v28i3.71>
3. **Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Lineamientos para el manejo programático de pacientes con tuberculosis farmacorresistente. Fecha de consulta: 17 de noviembre de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/micobacterias/Lineamientos%20manejo%20de%20Tuberculosis%20Farmacorresistente.pdf>.
4. **World Health Organization.** Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Geneva: WHO; 2008.
5. **Bwanga F, Hoffner S, Haile M, Joloba ML.** Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: A meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2009;9:67. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-9-67>
6. **Hain Lifescience.** Genotype® MTBDR*plus* product insert. Version 1. Fecha de consulta: 1 de noviembre del 2014. Disponible en: <http://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/genotype-mtldrplus.html>.
7. **Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Morarua N.** First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as rifampin and isoniazid resistances. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1264-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05903-11>
8. **Vilchèze C, Weisbrod TR, Chen B, Kremer L, Hazbon MH, Wang F, et al.** Altered NADH/NAD⁺ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:708-20. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.2.708-720.2005>
9. **Vilchèze C, Jacobs WR Jr.** Resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, mutations, and causalities. *Microbiol Spectrum.* 2014;2. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013>
10. **Rueda J.** Análisis molecular de la resistencia a isoniazida y etionamida en aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* multifármaco-resistentes. Tesis. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Pontificia Bolivariana; Medellín, 2014.
11. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Susceptibility testing of *Mycobacteria, Nocardiae* and other aerobic *Actinomycetes*. Approved Standard-Second edition. CLSI document M24-A2. Wayne: CLSI; 2011.
12. **Asencios L, Galarza M, Quispe N, Vásquez L, Leo E, Valencia E, et al.** Molecular test Genotype® MTBDR*plus*, an alternative to rapid detection of multidrug resistance tuberculosis. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2012;29:92-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1726-46342012000100014>
13. **Raizada N, Sachdeva KS, Chauhan DS, Malhotra B, Reddy K, Dave PV, et al.** A multi-site validation in India of the line probe assay for the rapid diagnosis of multi-drug resistant tuberculosis directly from sputum specimens. *PLoS One.* 2014;9:e88626. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088626>
14. **Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, Viljanen MK, Soini H.** Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:350-2. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.2.350-352.2006>
15. **Ling DI, Zwerling AA, Pai M.** GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: A meta-analysis. *Eur Respir J.* 2008;32:1165-74. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00061808>
16. **Jin J, Zhang Y, Fan X, Diao N, Shao L, Wang F, et al.** Evaluation of the GenoType® MTBDR*plus* assay and identification of a rare mutation for improving MDR-TB detection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16:521-6. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.11.0269>
17. **Rouse DA, Li Z, Bai GH, Morris SL.** Characterization of the *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:2472-7. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.39.11.2472>
18. **Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN, Roux L, York DF.** Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *aphC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa. *Tuber Lung Dis.* 2000;80:47-56.
19. **Heym B, Saint-Joanis B, Cole ST.** The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis.* 1999;79:267-71.
20. **Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Timothy C, Rodwell TC.** Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review. *PLoS One.* 2015;10:e0119628. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0119628>

21. **Abate D, Tedla Y, Meressa D, Ameni G.** Isoniazid and rifampicin resistance mutations and their effect on second-line anti-tuberculosis treatment. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014;18:946-51. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.13.0926>
22. **Müller B, Streicher EM, Hoek KG, Tait M, Trollip A, Bosman ME, et al.** *inhA* promoter mutations: A gateway to extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15:344-51.
23. **Machado D, Perdigo J, Ramos J, Couto I, Portugal I, Ritter C, et al.** High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with *inhA* double mutations. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:1728-32. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt090>
24. **Larsen MH, Vilchèze C, Kremer L, Besra GS, Parsons L, Salfinger M, et al.** Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 2002;46:453-66. <http://dx.doi.org/10.1046/j.13652958.2002.03162.x>
25. **Vilchèze C, Wang F, Arai M, Hazbón MH, Colangeli R, Kremer L, et al.** Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat Med.* 2006;12:1027-9. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1466>
26. **Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Richter E.** Evaluation of the GenoType MTBDR_{plus} assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2635-40. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00521-07>
27. **Tessema B, Beer J, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC.** Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2012;12:37. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-12-37>
28. **Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W.** Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:355-60. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01030-10>