

Mutaciones asociadas con resistencia a rifampicina o isoniazida en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de Sonora, México

Enrique Bolado-Martínez, D en C,⁽¹⁾ Ansix Pérez-Mendoza, QBC,⁽²⁾ Francisco Monserrat Alegría-Morquecho,⁽¹⁾ María del Carmen Candia-Plata, D en C,⁽³⁾ María del Rosario Aguayo-Verdugo, QB,⁽⁴⁾ Gerardo Álvarez-Hernández, D en C.⁽³⁾

Bolado-Martínez E, Pérez-Mendoza A, Alegría-Morquecho FM, Candia-Plata MC, Aguayo-Verdugo MR, Álvarez-Hernández G.
Mutaciones asociadas con resistencia a rifampicina o isoniazida en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de Sonora, México.
 Salud Publica Mex 2012;54:167-170.

Bolado-Martínez E, Pérez-Mendoza A, Alegría-Morquecho FM, Candia-Plata MC, Aguayo-Verdugo MR, Álvarez-Hernández G.
DNA mutations associated to rifampicin or isoniazid resistance in *M. tuberculosis* clinical isolates from Sonora, Mexico.
 Salud Publica Mex 2012;54:167-170.

Resumen

Objetivo. Realizar el análisis de regiones específicas de genes asociados con resistencia a isoniazida o rifampicina. **Material y métodos.** Se estudiaron 22 cepas de *M. tuberculosis*, aisladas en Sonora, México. Se utilizaron iniciadores para regiones específicas de los genes rpoB, katG e inhA y la región ahpC-oxyR. Los productos de PCR se secuenciaron y analizaron. **Resultados.** Se identificaron mutaciones en la región promotora del gen inhA, región ahpC-oxyR, codón 315 del gen katG y codones 451 ó 456 del gen rpoB. **Conclusiones.** La identificación de mutaciones no descritas previamente obliga a continuar el análisis genotípico de cepas aisladas en Sonora.

Palabras clave: *Mycobacterium*; mutación; resistencia a medicamentos; isoniazida; rifampicina

Abstract

Objective. To perform the analysis of specific regions of the major genes associated with resistance to isoniazid or rifampin. **Materials and methods.** Twenty two *M. tuberculosis* strains, isolated from human samples obtained in Sonora, Mexico. Specific primers for hotspots of the rpoB, katG, inhA genes and the ahpC-oxyR intergenic region were used. The purified PCR products were sequenced. **Results.** Mutations in the promoter of inhA, the ahpC-oxyR region, and codon 315 of katG and in 451 or 456 codons of rpoB, were identified. **Conclusions.** Detection of mutations not previously reported requires further genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Sonora.

Keywords: *Mycobacterium*; mutation; drug resistance; isoniazid; rifampin

- (1) Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- (2) Maestría en Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México
- (3) Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- (4) Laboratorio Estatal de Salud Pública. Hermosillo, Sonora, México

Fecha de recibido: 26 de febrero de 2011 • Fecha de aceptado: 18 de noviembre de 2011

Autor de correspondencia: Dr. Enrique Bolado-Martínez. Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales. 83000, Hermosillo, Sonora, México.
 Correo electrónico: ebolado@guayacan.uson.mx

La frecuencia de mutaciones específicas en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) resistentes a isoniazida o rifampicina, varía entre regiones geográficas. Las mutaciones más frecuentes en las cepas resistentes a rifampicina se localizan en los codones 432 al 458 del gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la enzima ARN polimerasa.¹ La resistencia de *M. tuberculosis* a la isoniazida involucra al menos cuatro genes: *katG*, que codifica la enzima catalasa-peroxidasa; el gen *inhA*, que codifica una proteína involucrada en la extensión de ácidos grasos; el gen *ahpC*, que codifica la alquil-hidroperóxido reductasa C y el gen *oxyR*, un importante regulador del estrés oxidativo.² En este trabajo se presentan los resultados iniciales de la caracterización genotípica de cepas clínicas de *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida o rifampicina aisladas en Sonora, México.^{2,3}

Material y métodos

Se analizaron 22 cepas clínicas de *M. tuberculosis* (cuadro I) aisladas e identificadas en el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) en Hermosillo, Sonora, México, de 2006 a 2009. Las cepas se mantuvieron en criopreservación a -70°C, hasta su reactivación para este estudio y fueron seleccionadas de acuerdo con: 1) su capacidad para desarrollarse adecuadamente en el medio de cultivo sólido 2) su perfil fenotípico de resistencia a fármacos, que fue realizado en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) de México, en 16 de las 22 cepas de acuerdo (cuadro I). Para aislar el ADN, se utilizó la matriz quelante Chelex-100 al 10% (modificado de referencia 4). Los procedimientos de PCR fueron realizados con iniciadores y procedimientos previamente descritos (cuadro II). Los productos de la amplificación se purificaron utilizando columnas GFX y se enviaron a secuenciación a Macrogen (Corea). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank, utilizando el algoritmo BLAST, disponible en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Resultados

En el cuadro I se muestran los perfiles de resistencia a isoniazida (INH) y rifampicina de 16 cepas, así como las mutaciones identificadas en el presente trabajo. Se detectaron cuatro inserciones en la cepa H10507: +CCA en -12 a -14 y +A en -17 del gen *ahpC*. Ninguna de estas mutaciones ha sido reportada previamente, por lo que se depositaron en GenBank (cepa H21408 con acceso HM355827 y cepa H10507 con acceso HM355826). No se

detectaron mutaciones en dos de las 11 cepas resistentes a INH (cuadro I, claves H8306 y H10407).

En el gen *rpoB*, también se detectaron dos mutaciones que no han sido descritas previamente, por lo que fueron depositadas en GenBank (cepa H13407 con acceso HM355829 y cepa H8309 con acceso HM355828). En dos cepas multidrogorresistentes (H8206 y H8708) sólo se identificaron mutaciones asociadas con resistencia a INH.

De las seis cepas que no se analizaron en el InDRE (cuadro I; claves H1709, H3109, H3409, H3509, H9709 y H2409) dos de ellas (H2409 y H1709) presentaron mutaciones asociadas con resistencia a isoniazida o rifampicina, respectivamente.

Cuadro I
PERFILES FENOTÍPICO Y GENOTÍPICO ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA A ISONIAZIDA Y RIFAMPICINA EN AISLAMIENTO CLÍNICOS DE *M. TUBERCULOSIS* DE SONORA, MÉXICO

Clave	Pruebas fenotípicas*		Pruebas genotípicas‡	
	INH	RIF	INH	RIF
H10507	R	R	+A(-17); +CCA(-12) <i>ahpC</i> - <i>oxyR</i> región intergénica	S456L
H21408	R	R	G (-74) A [-32 <i>oxyR</i>]	S456L
H7509	R	R	S315T <i>katG</i>	S456L
H11208	R	R	S315T <i>katG</i>	S456L
H8309	R	R	S315T <i>katG</i>	H451Y
H13407	R	R	S315R <i>katG</i>	H451Y
H8206	R	R	C (-15) T <i>inhA</i> promotor	NM
H8708	R	R	C (-15) T <i>inhA</i> promotor	NM
H4108	R	S	C (-15) T <i>inhA</i> promotor	NM
H13006	R	S	C (-15) T <i>inhA</i> promotor	NM
H14308	R	S	C (-15) T <i>inhA</i> promotor	NM
H10407	R	S	NM	NM
H8306	R	S	NM	NM
H5109	S	S	NM	NM
H5909	S	S	NM	NM
H7709	S	S	NM	NM
H2409	NR	NR	C (-15) T <i>inhA</i> promotor	NM
H1709	NR	NR	NM	S456L
H3109	NR	NR	NM	NM
H3409	NR	NR	NM	NM
H3509	NR	NR	NM	NM
H9709	NR	NR	NM	NM

* Resultados de la evaluación fenotípica en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

‡ Resultados del presente estudio.

INH: isoniazida; RIF: rifampicina; S: Susceptible; R: Resistente; NM: no se detectó mutación; NR: no realizado.

Cuadro II
INICIADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE
REGIONES ESPECÍFICAS DE LOS GENES *KATG*, *INH A*, *RPOB*
Y LA REGIÓN INTERGÉNICA *OXYR-AHP C* EN CEPAS DE
M. TUBERCULOSIS

Gen	Secuencia del iniciador	Referencia
katG1F	5'-TGCCCGCGGGTTCGACATT-3'	5
katG2R	5'-CCAGCAGGGCTCTTCGTCAG-3'	
katG290F	5'-ACTACGGGCGCTGTTTATC-3'	6
katG583R	5'-TCCTTGCCCAATAGACCTC-3'	
inhA1F	5'-CCTCGCTGCCAGAAAGGA-3'	5
inhA2R	5'-ATCCCCGGTTTCTCCGGT-3'	
inhA3F	5'-AGGTCGCCGGGGTGGTCAGC-3'	
inhA4R	5'-AGCGCCTTGCCATCGAAGCA-3'	
ahpC1F	5'-GCCTGGGTGTTCTGCTACTGGT-3'	7
ahpC2R	5'-CGCAACGTCGACTGGCTCATA-3'	
LIPAOP1	5'-GAGAATTCGGTCGCGGAGCTGATCC-3'	8
LIPAOP2	5'-GGAAGCTTGACCCGCGGTACACC-3'	
RRDRCIISF	5'-TCGGCATGTCGCGGATGGAG-3'	9
RRDRCIISR	5'-GTACACGATCTCGCTAACC-3'	

Discusión

De las 16 cepas con resultados previos de drogorresistencia, seis mostraron resistencia exclusiva a isoniazida, siete fueron multidrogorresistentes (resistentes a isoniazida y rifampicina) y tres fueron susceptibles a ambos fármacos. La mutación S315T se presentó en 27.3% de las cepas, un porcentaje cercano al reportado por Guo y colaboradores (36.3%) en aislamientos de EUA.¹⁰ La frecuencia de esta mutación varía entre regiones geográficas desde 54.7% en Corea,¹¹ hasta 91.7% en San Petersburgo (Rusia).³ En Monterrey, México, esta mutación se observó en 67.6% de 25 aislamientos clínicos resistentes a INH,¹² mientras que en el Sureste de México se demostró que 52% de 17 aislamientos presentaban esta mutación.¹³ En el mismo codón (*katG* 315) se detectó una mutación poco frecuente en el nucleótido 945, que produjo la sustitución S315R. Esta mutación sólo se ha observado en una cepa recuperada de un paciente en China.¹⁴ Otras dos mutaciones no reportadas previamente fueron observadas en la región intergénica *ahpC-oxrR*.

En la región promotora del gen *inhA*, la mutación más frecuente (-15C>T),¹² con prevalencia de 23.7% en Brasil⁷ a 66% en EUA,^{5,10} se detectó en cinco (38.46%) de las cepas resistentes a INH. No se observaron mutaciones del gen *inhA* en la región de los residuos 13 al 379, que son poco frecuentes.^{1,15} En dos de las cepas con resistencia fenotípica a INH no se demostraron mutacio-

nes en los segmentos evaluados; es probable que estas cepas presenten mutaciones en regiones de los genes que no fueron analizados, como *kasA* o *ndh*.^{3,7}

En el gen *rpoB* se detectaron dos mutaciones; 50% de las ocho cepas resistentes a rifampicina tuvieron una mutación S456L, un porcentaje menor al reportado por Heep y colaboradores (65%) en aislamientos clínicos de Alemania.¹⁶ La mutación H451Y del gen *rpoB*, no descrita previamente, fue detectada en dos cepas. Dos cepas resistentes a rifampicina (H8206 y H8708) no mostraron mutaciones en las regiones estudiadas del gen, lo que podría deberse a que sólo se estudiaron los sitios "calientes" o con mayores tasas de mutación del gen *rpoB*. Considerando que en este estudio preliminar se detectaron nuevas mutaciones, es recomendable realizar la caracterización genotípica sistemática de todas las cepas clínicas de *M. tuberculosis* que presenten resistencia a cualquier fármaco antituberculoso, en Sonora, México.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, mediante apoyo CONACYT 110377/95337: "Apoyos complementarios para la consolidación institucional de grupos de investigación; modalidad: retención".

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Referencias

- Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:496-514.
- Caws M, Tho DQ, Duy PM, Lan NTN, Hoa DV, Torok ME, et al. PCR-restriction fragment length polymorphism for rapid, low-cost identification of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007;45:1789-1793.
- Aragón LM, Navarro F, Heiser V, Garrigó M, Español M, Coll P. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:825-831.
- Iralu JV, Sritharan VK, Pieciak WS, Wirth DF, Maguire JH, Barker RH Jr. Diagnosis of *Mycobacterium avium* bacteremia by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:1811-1814.
- Morlock GP, Metchock B, Sikes B, Crawford JT, Cooksey RC. *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3799-3805.
- Hillemann D, Rüh-Gerdas S, Richter E. Evaluation of the genotype MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45:2635-2640.
- Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, et al. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant

- Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3373-3381.
8. Cavusoglu C, Hilmioğlu S, Guneri S, Bilgic A. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. J Clin Microbiol 2002;40:4435-4438.
9. Caoili JC, Mayorova A, Sikes D, Hickman L, Plikaytis BB, Shinnik TM. Evaluation of the TB biochip oligonucleotide microarray system for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2006;44:2378-2381.
10. Guo H, Seet Q, Denkin S, Parsons L, Zhang Y. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. J Med Microbiol 2006;55:1527-1531.
11. Cho EH, Bae HK, Kang SK, Lee EH. Detection of isoniazid and rifampicin resistance by sequencing of *katG*, *inhA*, and *rpoB* genes in Korea. Korean J Lab Med 2009;29:455-460.
12. Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendón A, Yang Z, Cave MD, Graviss EA. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. J Med Microbiol 2004;53:107-113.
13. Zenteno-Cuevas R, Zenteno JC, Cuellar A, Cuevas B, Sampieri CL, Riviera JE, et al. Mutations in *rpoB* and *katG* genes in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the southeast of Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104:468-472.
14. Wu XQ, Lu Y, Zhang JX, Liang JQ, Li HM, Zhang GY, et al. Detection of the mutations in *katG* 315 and *inhA* -15 of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from chinese patients. Chin Med J (Engl) 2006;119:230-233.
15. Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2003;41: 4471-4474.
16. Heep M, Brandstätter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Rüh-Gerdas S, et al. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol 2001;39:107-110.