



# Diagnóstico de tuberculosis multidrogoresistente mediante PCR en tiempo real

**Autor:** Roberto Zenteno Cuevas

Betzaida, Sampieri Clara, Riviera. Pariss Aurora.

**Área de Investigación:** Biomedicina

**Tipo de Autor:** Docente y Profesional de la salud

**Institución:** UNIVERSIDAD VERACRUZANA

**Año Residencia:** 2008

**Hospital:** hospital

**Matrícula / Número Personal:** 27466

**Teléfono Laboral:** 8418900

**Teléfono Particular:**

**Email:** rzenteno@uv.mx

**Coautores:** Zenteno Juan Carlos, Cuellar Aremy, Cuevas

**Número de registro:** s/n

**Dependencia:** Instituto De Salud Publica

**Extensión:** 13321

**Teléfono Celular:**

**Email Alternativo:**

## Argumentación teórica:

La tuberculosis (TB), anualmente causa afectaciones a 9 millones de personas y la muerte de casi 3 millones y se considera que 1 de cada 3 seres humanos padece algún grado de infección<sup>1</sup>. Por lo que la TB se considera como una de las enfermedades infecciosas más importantes para la salud publica global.<sup>2</sup> Desafortunadamente el futuro epidemiológico de la TB no es muy alentador, de acuerdo a la OMS la aparición de tuberculosis en pacientes con VIH y diabéticos, está conformando un escenario gris el cual se agrava considerablemente con los fenómenos de drogo (DR), multi (MDR) y drogoresistencia extrema (XDR), los cuales están adquiriendo signos de emergencia para la salud pública en países de África, Europa del Este, Unión Soviética, China, Irán e India. <sup>3-5</sup>

## Argumentación empírica:

Las pruebas tradicionales para el diagnóstico de drogoresistencia parten de un cultivo positivo de *Mycobacterium*, seguido de subcultivos que se exponen a la droga para evaluar su susceptibilidad, lo cual requiere en total de 6 a 9 semanas, o 5 a 8 si se emplean métodos radiométricos (BACTEC) o fluorométricos (MGIT), contribuyendo con este tiempo a la transmisión de la TB MDR.<sup>4</sup> Es por lo anterior que en los últimos años se han venido desarrollando un gran número de metodologías moleculares basadas en el análisis de los genes causantes de la drogoresistencia, buscando las mutaciones que expliquen dicho comportamiento.<sup>6-7</sup> Así tenemos el análisis de polimorfismos conformacionales de hebra sencilla (ssCP), Migración heteroduplex, Hibridación con fagos, secuenciación de genes, y mas recientemente la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR), la cual permite identificar

las mutaciones causantes de la drogoresistencia.<sup>8-10</sup> En general estas técnicas tienen la ventaja de ser específicas y rápidas, generando diagnóstico en cuestión de horas, sin embargo presentan limitantes que impiden su directa aplicación en el campo, por lo que requieren evaluarse en las muestras clínicas a fin de evaluar su sensibilidad y especificidad.<sup>11</sup>

## Planteamiento del problema:

A nivel mundial se estima que un 3.2% de las personas con TB son portadores de una cepa TB-DR<sup>12</sup>; la Organización Panamericana de la Salud (OPS) notificó que México se ubica dentro de los 5 países con mayor incidencia en América Latina.<sup>12</sup> De acuerdo a la Secretaría de Salud para el 2005 se reportaron 450 casos de TB-DR y Veracruz aportó 150 casos (33%), colocándose como uno de los tres estados del país con mayores aportaciones.<sup>13</sup> Estos datos ubican a la TB-DR como una de las problemática más importantes a atender dentro de los programas de salud nacional<sup>14</sup> y estatal.<sup>15</sup> Adicionalmente es claro que los métodos tradicionales para el diagnóstico de TB-DR no son viables para establecer a un mediano y largo plazo procedimientos de control y futura erradicación, por lo que es necesario desarrollar y evaluar la utilidad de nuevas tecnologías moleculares, más rápidas, exactas, confiables, sensibles y específicas.

## Objetivo General:

Desarrollar un sistema de detección de drogoresistencia en tuberculosis por PCR-TR.

## Metodología:

1.- Colecta de cepas TB-DR de referencia. Muestras de

expectoración de paciente con cuadro clínico presuntivo de drogoresistencia (TB-DR) se descontaminaron y cultivaron en medio LJ, el perfil de drogoresistencia se determinó mediante BACTEC. Adicionalmente se recolectaron expectoraciones con basciloscopía positiva (BA+). La extracción de ADN geonómico se realizó empleando métodos tradicionales.

2.- Estandarización de la técnica de PCR-TR. Se diseñaron los primeros y las sondas de hibridación responsables de reconocer las mutaciones que confieren resistencia a rifampicina, gene *rpoB* (mutación c/G en el codón 531) e isoniacida, gene *katG* (mutación G/C en el codón 315). Se estandarizaron la concentración de ADN, los reactivos y condiciones de reacción. La amplificación y evaluación post-corrida se realizaron mediante el programa de Discriminación Alelica en el equipo de PCR-TR 7500 (Applied Biosys.). Una vez estandarizado, se aplicó a las muestras TB-DR y BA +.

3.- Secuenciación de *rpoB* y *katG* en las cepas TB-DR. En las cepas TB-DR se establecieron las condiciones de PCR para obtener un producto de 280pb del gene *rpoB* y de 580 pb de *katG* contenido el SNP 531 y 315 respectivamente. Estos se aplicaron a un secuenciador capilar, "ABI Prism 7500" (Applied Biosys.). El análisis de cada secuencia se realizó mediante el programa Chromas V.2.3 y la comparación de los genes fue mediante un alineamiento múltiple empleando ClustalV, empleando las secuencias de referencia *rpoB* (888164) y *katG* (X68801), obtenidas a través del GenBank.

## Resultados:

Se recolectaron 110 BA+ y 25 cepas TB-DR, 15 presentaron drogoresistencia a rifampicina (rif+) y 17 a isoniacida (iso+), 15 fueron resistentes a ambas drogas (TB-MDR). El ensayo de discriminación alélica permitió, en un lapso de 24 hrs, identificar en las 15 cepas rif+, a 5 como portadoras del SNP G/C 531, 8 (53%) no lo son y 2 (13%) no dieron señal de amplificación. En las 17 cepas iso+, 8 (47%) presentaron el SNP 315, en 8 (47%) ausente y en 1 (6%) sin señal. Las cepas rif- e iso- y *M. tuberculosis* se ubicaron sin la mutación. 3 BA+ mostraron la mutación 531 de *rpoB* (3%) y 3 la mutación 315 en *katG* (3%), 1 (0.9%) mostró mutaciones para ambos genes (MDR). La secuenciación de *katG* y *rpoB* confirmaron la presencia o ausencia de las mutaciones, lo cual permitió establecer una sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR-TR cercano al 80%.

## Discusión:

Este es el primer reporte donde se describe un método estandarizado de diagnóstico múltiple de drogoresistencia a isoniacida y rifampicina a partir de la identificación rápida y específica de los SNPs *rpoB*-531 y *katG*-315 por PCR-TR, su aplicación en la clínica y su empleo en el diagnóstico se aprecian

como atractivos. Adicionalmente también se describen por vez primera las características moleculares de cepas de TB-DR provenientes de la región sur del país.<sup>16-20</sup> Es de llamar la atención el comportamiento de las mutaciones identificadas, el cual coincide poco con lo reportado en la literatura<sup>22-24</sup> y muestra además una alta heterogeneidad de cepas circulando en la población, lo que establece un comportamiento muy particular para el estado, y obliga a considerar medidas de intervención específicas.

## Referencias Bibliográficas:

1. World Health Organization. WHO Site. Tuberculosis. Fact sheet N°104 Revised 2007. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> [consultado 28 de Mayo 2007].
2. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2006, Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2006.362): 83-85.
3. Tapia R. El Manual de Salud Pública. Unidad II. Capítulo 6 Tuberculosis. 2<sup>da</sup>ed. Editorial Intersistemas. México 2006. pp 469-505
4. Zenteno R. Tópicos Selectos de la Salud Pública. Tuberculosis: realidades y perspectivas. Universidad Veracruzana. Instituto de Salud Pública. 2006. pp 9-28.
5. Zumla A, Grange JM. 2001. Multidrug-resistant tuberculosis can the tide be turned?. *Lancet Infect. Dis.* 1:199-202.
6. Quirós-Roldán E, Airoldi M, Moretti F, Carosi G. Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Diagn Biol.* 2001; 50(4):25-32
7. Caws M and Drobniowski. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. *Annals new York academy of sciences.* London. 2001;953:138-145.
8. Tanil Kocagoz Zeynep Saribas y Alpaslen Alp. Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005; 43(12):6015-6019
9. García de Viedma. Rápid detección de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2003; 9: 349-359.
10. Parashar D, Chahuan D, Sharma V, Katoch V. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian J Med Res.* 2006; 124:385-398.
11. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006; 6(3):423-32.
12. Organización Panamericana de Salud. América Latina y el Caribe. Oficina de Información Pública, OPS. Washington DC - Estados Unidos. 2007. disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> [consultado 28 de Agosto 2008]
13. Secretaría de Salud de Veracruz. Dirección general de epidemiología. Casos de tuberculosis en la República Mexicana. 2006.
14. Secretaría de Salud. Programa nacional de Salud 2007-2012.
15. Servicios de Salud de Veracruz. Programa sectorial de salud 2005-2010.
16. Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, et al. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol.* 2004; 53(2):107-13.
17. Viader-Salvadó JM, Luna-Aguirre CM, Reyes-Ruiz JM, et al. Frequency of mutations in *rpoB* and codons 315 and 463 of *katG* in rifampin- and/or isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northeast Mexico. *Microb Drug Resist.* 2003;9(1):33-8.
18. Alvarado C, Rossau R, Martínez S, et al. Characterization of *rpoB* gene

mutations in rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients at 5 Mexican public hospitals. *Rev Invest Clin.* 2001; 53(6): 526-530

19. Granich RM, Balandrano S, Santaella AJ, et al. Survey of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican states, 1997. *Arch Intern Med.* 2000; 160(5):639-44.

20. Bobadilla del Valle M, Ponce-de-Leon A, Arenas-Huertero C, et al. rpoB Gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism. *Emerg Infect Dis.* 7(6):1010-1013.

21. National Survey on TB drugresistance, Mexico. Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en tuberculosis, México 2008. PAHO/INDRE, México. (<http://www.mex.who.int/contenidos/tuberculosis/encuesta/>). (12 July 2007, date last accessed).

22. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(10):2054-8.23.- Höfling CC, Pavan EM, Giampaglia CM, et al. Prevalen