



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y MUTACIONES ASOCIADAS CON RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN CEPAS CLÍNICAS DE *Mycobacterium tuberculosis*

Karla Fabiola Chacón Vargas, Sergio Andrade Ochoa, Oscar Pizano Martínez, Leticia García Casanova, Tania Siqueiros Cendón, Gilberto Erosa De La Vega, Sigifredo Arévalo Gallegos, Salvador Pizarro Chávez, Feliciano Milián Sauzo, Blanca Estela Rivera Chavira. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Chihuahua, Chih., México. C.P. 31125. kchacon@uach.mx

Palabras clave: *M. tuberculosis*, resistencia, fármacos

**Introducción.** La tuberculosis es una enfermedad reemergente de gran problemática a nivel mundial causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Actualmente los esquemas de tratamiento y control están siendo rebasados por el surgimiento de cepas resistentes a los principales fármacos: isoniacida (INH), rifampicina (RIF), estreptomycin (STM), etambutol (ETB) y pirazinamida (PZA) (1), donde la resistencia es adquirida por mutación cromosomal espontánea y cada fármaco se ha relacionado con uno o más genes involucrados siendo los principales *katG*, *rpoB*, *rpsL*, *embB* y *pncA* respectivamente (2).

El objetivo de esta investigación fue caracterizar mutaciones asociadas con la resistencia a fármacos de primera línea y establecer la epidemiología molecular en cepas de *M. tuberculosis* recuperadas de pacientes fímicos de la Cd. de Chihuahua, Chih.

**Metodología.** Se reactivó y caracterizó microbiológica y molecularmente una colección de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes fímicos. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas para INH, RIF, STM y ETB se determinó por el método colorimétrico de Azul Alamar (3), mientras que la susceptibilidad a PZA se evaluó con el método de Wayne (4). Para cada antibiótico se seleccionaron algunas de las cepas que mostraron resistencia y se analizaron molecularmente mediante amplificación y secuenciación de un fragmento del principal gen relacionado. Finalmente se hizo el análisis de variabilidad genética y tipificación de cepas mediante spoligotyping (5).

**Resultados.** El cepario quedó constituido por 39 cepas de *M. tuberculosis*, la frecuencia de resistencia fue variable entre fármacos: INH 40%, RIF 67.5%, STM 92%, ETM 16% y PZA 0%, en la mayoría de los casos los niveles de resistencia fueron de bajos a medianos. El 35% de los aislados mostró el fenotipo de multidrogorresistencia (MDR). En los cuatro genes analizados para la caracterización molecular, se detectaron diversas alteraciones genéticas (Tabla 1), además de localizar mutaciones congruentes con las ya reportadas bibliográficamente se detectaron otras más de las cuales no hay reporte previo. Por otra parte, varias de las cepas resistentes no mostraron mutaciones en las regiones analizadas, lo cual incita a evaluar otras regiones del gen o bien alguno de los otros genes relacionados con la resistencia al antibiótico en cuestión.

Se logró la tipificación molecular de 35 cepas mediante spoligotyping, de las cuales solo 4 espoligotipos fueron ubicados en la base de datos internacional SpoIDB4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/index.jsp>) lo cual sugiere que la mayoría de las cepas son endémicas y de baja diseminación. El dendrograma mostró una amplia variabilidad genética en las cepas y quedaron distribuidas en cuatro grupos principales que muestran coeficiente de similitud relativamente altos (>0.90).

Tabla 1. Mutaciones encontradas en genes analizados según el fármaco

INH (232 pb <i>katG</i> )			RIF (411pb <i>rpoB</i> )		
Cepa	codón nucleótidos aminoácido	CMI	Cepa	codón nucleótidos aminoácido	CMI
CH08	297 GGC→GTC Gly→Val	4µg/ml	CH06	428 AGC→ATG C Ser→Met	4µg/ml
	315 AGC→ACC Ser→Thr			431 AGC→ATG C Ser→Met	
	325 CCG→CCT Pro→Pro			448 CGA→TCG A Arg→Ser	
CH15	297 GGC→GTC Gly→Val	8µg/ml	CH07	459 CGT→TCG T Arg→Ser	4µg/ml
	322 ACG→ACT Thr→Thr			435 GAC→GAT Asp→Asp	
	325 CCG→CTG Pro→Leu			439 GTC→CAG Val→Asp	
CH18	281 GCC→GAC Ala→Asp	4µg/ml	CH09	438 AAC→AAAC Asn→Lys	4µg/ml
CS03	300 TGG→TGC Trp→Cys	4µg/ml	CH16	433 TTC→GTT C Phe→Val	4µg/ml
Cepas sin mutación				435 GAC→GAT Asp→Asp	
CH05 CH10 CH19 CH23 CS02 (CMI 4µg/ml)				471 CCG→TCG Pro→Ser	
CH09 CS16 (CMI 8µg/ml)			Cepas sin mutación CH17 CH28 (CMI 4µg/ml)		
ETB (364 pb <i>embB</i> )			STM (272 pb <i>rpsL</i> )		
Cepa	codón nucleótidos aminoácido	CMI	Cepa	codón nucleótidos aminoácido	CMI
CH09	317 TCC→CTC C Ser→Leu	16µg/ml	CH03	27 ACG→ATC G Ser→Met	32µg/ml
	265 ATG→ATA Met→Ile			27 ACG→TAC G Ser→Tyr	
CH10	265 ATG→ATA Met→Ile	32µg/ml	CH06	27 ACG→TAC G Ser→Tyr	32µg/ml
Cepas sin mutación			Cepas sin mutación CH08 CH17 CH21 CH23		
CH04 CH18 CH24 CS02 (CMI 16µg/ml)			CH26 CH28 (CMI 32µg/ml)		

**Conclusiones.** De cada una de las cepas se obtuvieron características fenotípicas y genotípicas importantes que evidenciaron la diversidad y características de las cepas circulantes en la ciudad de Chihuahua al demostrarse la presencia de cepas resistentes y sin reporte de distribución en otras partes del mundo, lo anterior es de gran utilidad como base de datos inicial para estudios epidemiológicos y para evaluar la efectividad de los esquemas de tratamiento actuales.

### Bibliografía.

- Dorronsoro I., Torroba L. (2007). *An. Sist. Saint. Navar.* 30(2):67-84.
- Zhang Y., Vilcheze C., Jacobs W. (2005). Mechanisms of drugs resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. En *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. ASM Press. E.U.A. 115-136.
- Franzblau G., Witzig S., McLaughlin J., Torres P., Madico G., Hernández A., Degnan M., Cook B., Quenzer V., Ferguson R., Gilman R. (1998). *J. Clin. Microbiol.*, 36(2):362-366.
- Balandrano S., Anzaldo G., Pena G., Bentacourt X. (1996) *Tuberculosis, Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE/SAGAR.* (A. E. Gutierrez, Ed.)
- Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., Van Agterveld M., Van Spingen D., Kijper S., Bundhoten A. Molhuizen H., Shaw R., Goal M., Van Embden, J. (1997). *J. Clin. Microb.*, 35(4):907-914.