

SECUENCIACIÓN GENÉTICA Y MUTACIONES CROMOSÓMICAS EN CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTES A RIFAMPICINA

ALEXANDER GALINDO

FRANCISCO BECERRA

MAURICIO PATIÑO H.

Investigadores Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico.

Universidad Distrital Francisco José de Caldas;

ANDRÉS LORENTE

PATRICIA DEL PORTILLO

Corporación CorpoGen

SALIM MATTAR

Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico,

Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Córdoba

INTRODUCCIÓN

Los individuos afectados con *Mycobacterium tuberculosis* son más de un billón y cerca de 3,5 millones enferman anualmente en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que estamos ante una emergencia global de tuberculosis que podría provocar 200 millones de casos nuevos y 70 millones de muertes antes del 2020. Se estima que en 1998 fueron reportados 8.8 millones de casos nuevos y que fallecieron por esta causa cerca de 3 millones de personas, 6% de la mortalidad global del año. La alta incidencia en la población, la convierte en la principal causa de muerte en adultos en edad productiva, es decir de 15 a 49 años. Se considera que 80% de la población está dentro del grupo de alto riesgo que puede padecer esta enfermedad y se asume que más de 50 millones de personas están infectadas con cepas resistentes (Guerrero, 1998 y Rattan 1998).

Entre 1995 y 1998 la incidencia mundial aumentó 16%, siendo más notable en países pobres, confinando la enfermedad, al parecer, a regiones específicas como el sudeste asiático o el África subsahariana. Hoy en día la enfermedad se ha diseminado de manera alarmante por todo el planeta con gran incidencia y severidad debido, en gran parte, a la pandemia del SIDA (Rattan, 1998) adquiriendo proporciones importantes en Europa, Norte América y demás países industrializados (Rattan, 1998). En Colombia, específicamente en Bogotá, los casos de egresos hospitalarios a causa de la tuberculosis en la población de 0 a 60 años ascienden a 286 casos para el año de 1997 (Sistema Nacional de Salud). Los casos de tuberculosis resistentes a los medicamentos se están incrementando por todo el mundo; en muchos casos, este fenómeno se debe a que los tratamientos no se cumplen adecuadamente o se recetan mal ya que dejan de tomarse antes de tiempo cuando los síntomas han desaparecido pero la bacteria sigue viva, fomentando la aparición de variantes resistentes (Mattar y Sánchez, 1999).

El objetivo del estudio fue secuenciar 3 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de muestras aisladas en los hospitales San Juan de Dios y Santa Clara de Bogotá (Colombia) en los años 1997 a 1998 que presentan resistencia a rifampicina, mediante la técnica de Sanger.

MATERIALES Y MÉTODOS

De una colección de 50 cepas resistentes a diferentes fármacos se tomaron 3 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina, las cuales fueron recolectadas durante 1997 y 1998 en los Hospitales San Juan de Dios y Santa Clara en Bogotá, y luego tipificadas en el Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS) (Sánchez, 1999). Las cepas se inocularon en medio Lowestein-Jensen a 37°C, y simultáneamente se hizo cultivo en medio líquido BACTEC 460 TB. Para la extracción de DNA del medio sólido Lowestein-Jensen se tomaron 2 colonias, se resuspendieron en 500ml de Buffer de Lisis (TE1x - Tween 20 1%), se agitó fuertemente mediante vortex, se llevó a punto de ebullición durante 15 minutos, se centrifugó por un minuto a 14.000rpm, se conservó el sobrenadante y se refrigeró a 4°C (Yoder, 1999). La amplificación se realizó mediante PCR, utilizando 5ml del sobrenadante con los *primers* específicos rpoB 105: (5' CGT GGA GGC GAT CAC ACC GCA GT3') y rpoB 273 (5' AGT GCG ACG GGT GCA CGT CGC GGA CCT 3') diseñados en otro estudio (Whelen, 1994). Las concentraciones de la mezcla maestra para cada tubo fueron: Buffer 1x, Taq DNAPolimerasa en buffer de resuspensión A (TucánTaq, Corpogen) 0.01U/ml, dNTPs 0.2mM, MgCl₂ 1.5mM, Glicerol al 10%, *primers* 5pmol, en un volumen final de 25ml. Se utilizó el termociclador PCR System 2400 Perkin Elmer, (Norwalk, CT, USA). Las condiciones de amplificación fueron 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, anillaje a 68°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, seguidos de una extensión final a 72°C por 2 minutos.

Los productos de la reacción fueron analizados en geles de agarosa 2%. La purificación de ADN amplificado se realizó por columnas a partir de bandas del gel según el protocolo del *Qiaquick Gel Extraction Kit* de Qiagen. Los fragmentos se mandaron secuenciar en Seqwright mediante el método de Sanger (Sambrook, *et al.*, 1989). Los análisis de los resultados de la secuencia fueron realizados con la ayuda de las bases de datos: <http://workbench.sdsc.edu/>, <http://tigem.it/ASSEMBLY/assemble.html> <http://arep.med.harvard.edu/labgc/aduan/projects/utilities/revcomp.html>

Para cada cepa se obtuvieron dos secuencias (una en dirección 5' -3' y otra en la opuesta) se alinearon usando Contig (ASSEMBLY) y Biology Workbench para eliminar los errores de la secuencia en los extremos 3' y 5'. Luego se realizaron alineamientos múltiples usando Blast, ClustalW y Boxshade (Biology Workbench) entre RpoB1, RpoB2, RpoB3 las de referencia, las reportadas en la literatura y en el Genbank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas por nosotros se encuentran dentro del grupo de crecimiento lento de las mycobacterias en un tiempo de 20 a 30 días según Casal (1989). Se pudo hacer una valoración del crecimiento de las cepas resistentes a rifampicina en la fase preliminar del estudio mediante el empleo del BACTEC 460 TB que tiene un desempeño igual al descrito por Sánchez (1999). A continuación se muestra la obtención de las secuencias de las 3 cepas directas después de haber sido depuradas (Contig) ver Materiales y Métodos:

rpoB1

CGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGAT
 CAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAAACCCGCTG
 TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTACAGT
 GAGCGTGCCGGGCTGGAGGTC

rpoB2

CGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGAT
 CAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAAACCCGCTG
 TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTTGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTACAGT
 GAGCGTGCCGGGCTGGAGGTC

rpoB3

CGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGAT
 CAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAAACCCGCTG
 TCGGGGTTGACCTACAAGCGCCGACTGTTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTACAGT
 GAGCGTGCCGGGCTGGAGGTC

Para la secuencia rpoB1, aunque no presenta mutaciones puntuales en esta región, su resistencia debe estar asociada a mutaciones en regiones corriente arriba o debajo de la región donde se presenta usualmente el mayor número de éstas o a sustituciones silentes (Musser, 1995 y Cole, *et al.*, 1998) ó se pueden encontrar en regiones diferentes al gen rpoB (Rattan, 1998). Las mutaciones presentes en las secuencias rpoB2 rpoB3 son del tipo transición que se presenta en el codón 531 en rpoB2, cuyo cambio fue TCG (Ser) a TTG (Leu), mientras que en la cepa rpoB3 el cambio presentado en el codón 526 es una transición de CAC (His) a TAC (Tir). Otro de los análisis realizados mediante Boxshade da un alineamiento entre las cepas secuenciadas por nosotros y la tomada como cepa patrón (Whelen, *et al.*, 1995), (fig. 1). En nuestro estudio las mutaciones halladas están la región donde se ha reportado el mayor número de éstas (69 pb). Kapur, *et al.*, (1994) reporta cepas que presentaban en el codón 526 cambios de CAC (His) a TAC (Tyr) siendo éste responsable cerca de 30% de las mutaciones de su colección, y se comprueba que las mutaciones de este tipo representan sólo 12% para estudios similares reportados (Kapur, *et al.*, 1994). En similitud, alrededor de 25% de las cepas reportadas mundialmente tienen mutaciones en el codón 531 TCG (Ser) a TTG (Leu) que en conjunto representan 47% en estudios llevados a cabo por Kapur, *et al.*, (1994). Se ha demostrado que la mayoría de organismos resistentes tienen una de las mutaciones previamente descrita y por lo menos 5 nuevas mutaciones asociadas a la resistencia a rifampicina. En otro estudio a cepas resistentes de *M. tuberculosis* recogidas de pacientes alrededor del mundo, se estableció qué mutaciones se encuentran en los aminoácidos 507 al 533 (Muser, 1995). En 1999 se realizaron estudios en Brasil, Australia, Italia y Corea en los cuales se secuenciaron segmentos de gen rpoB que van desde 69pb a 306pb. Las mutaciones reportadas en estos estudios van desde los codones 513 a 533, presentándose una mayor cantidad de mutaciones en los codones 516 y 526. Las mutaciones en las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina trabajadas por nosotros son similares a las publicadas, sin embargo, son pocos los estudios realizados de este tipo para la caracterización de tan importante enfermedad en Colombia y especí-

ficamente en Bogotá. Sería interesante realizar otros estudios que incluyan análisis filogenético que indiquen la distribución geográfica de las cepas en Colombia en relación con las mundialmente reportadas. La identificación de estas mutaciones será útil como posterior marcador epidemiológico en los aislamientos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

- CASAL, M. 1989. Microbiología Clínica de Enfermedades por Micobacterias; Tuberculosis, Lepra y Micobacteriosis. Editorial. España. 233p.
- COLE S.T., et al . 1998 (Junio). Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the Complete Genome Sequence. In .Nature. Vol 393. No 539. 650p.
- GUERRERO, M. 1998 (Jun-Agt). Avances en Biología Micobacteriana: Nuevos Métodos de PCR y RFLP para Detección, Identificación y Tipificación. EN MÉDICAS UIS. Vol 12 pp188-194.
- KAPUR, V., LI LL., IORDANESCU S., HAMRICK M. R., WAGNER A., KREISWIRTH B. N. & MUSSER J. M. 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA Polimerase B Subunit in rifampin *Mycobacterium tuberculosis*. Strains from the New York City and Texas. Journal Clinical Microbiology. 32. 3p.
- MATTAR S. & SÁNCHEZ L. 1999. Quimioterapia de la Tuberculosis: Infecciones Hospitalarias. Ed. Médica Panamericana. 2 ed, 577-592
- MUSSER, M. James. 1995. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria, Molecular Genetic Insights. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 8. 16p.
- RATTAN A. 1998. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. Emerging Infectious Diseases. Vol. 4 Pp195-209.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. & MANIATIS, T. Molecular 1989. Cloning a Laboratory Manual. 2 ed. New York: cold spring Harbor Laboratory press; 1989. 18.88p.
- SÁNCHEZ, L. 1999. Susceptibilidad a los Fármacos Antituberculosos en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, Pontificia Universidad Javeriana.
- WHELEN, C.; FELMLEE, T.; HUNT, J.; WILLIAMS, D.; ROBERTS, G.; STOCKMAN, L.; PERSING, D. 1995 (Mar). Direct Genotypic Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Rifampin Resistance in Clinical Specimens by Using Single-Tube Heminested PCR. Journal Clinical Microbiology. Vol. 33, No. 3 pp 556-561.
- YODER, S.; HOLTZMAN, T.; ARONSON, T.; BERLIN, O.; FROMAN, S.; ARGUETA, C.; TOMASEK, P.; GLOVER, N. & STELMA, Jr. 1999. PCR Comparison of *Mycobacterium avium* Isolates Obtained from Patients and Foods. 1999. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65. No. 6 pp 2650-2653.