



**TERCERA
SECCIÓN**
**Artículos
estudiantiles**



Estandarización de la PCR en tiempo real por análisis de curvas melting para la detección de tuberculosis drogoresistente

Standardization of real-time PCR by analysis of fusion curves for the detection of drug-resistant tuberculosis

MERCADO MICHEL, BRAYAN GABRIEL¹
VASQUEZ MICHEL, ANETH¹

FECHA DE RECEPCIÓN: 14 DE AGOSTO DE 2018

FECHA DE ACEPTACIÓN: 19 DE SEPTIEMBRE DE 2018

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa-contagiosa, causada por diversas especies del *Complejo Mycobacterium tuberculosis*, actualmente se estima que un tercio de la población mundial se encuentra afectada por lo que representa una amenaza para la salud pública, principalmente por el surgimiento de cepas Multidrogoresistentes (MDR-TB) que presentan resistencia a Rifampicina e Isoniacida simultáneamente, fármacos de primera línea para el tratamiento de esta enfermedad. En la actualidad se emplean métodos moleculares para la detección de este agente infeccioso, en nuestro medio existen muy pocos o ningún trabajo acerca de la aplicación de métodos moleculares para la detección precisa y efectiva de cepas MDR-TB, es decir que además de identificar su presencia pueda darse un perfil de resistencia por lo menos a fármacos de primera línea. En este trabajo se estandarizó la técnica

Abstract

Tuberculosis is an infectious-contagious disease, caused by several species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, today it is estimated that one third of the world population representing a threat to public health, mainly by the emergence Multidrug-resistant strains (MDR-TB) that express resistance to Rifampicin and Isoniazid simultaneously. Although currently molecular methods are used for the detection of this infectious agent, in our medium there are no studies about the application of molecular methods for the accurate and effective detection of MDR-TB strains.

The present study intends to standardize the Real Time PCR technique by Melting Curves Analysis for the detection of mutations in specific genes that cause resistance to these antituberculosis drugs.

Eleven strains of *Mycobacterium tuberculosis* phenotypically identified by culture

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular Instituto Servicios de Laboratorios de Diagnóstico e Investigación en Salud "SELADIS"

* Correspondencia: anethvasquez@gmail.com

ca PCR en Tiempo Real por Análisis de Curvas Melting para la detección mutaciones en genes específicos que otorgan resistencia a estos antituberculosos utilizando un kit comercial.

Se utilizaron once cepas de *Mycobacterium tuberculosis* fenotípicamente identificadas por cultivo y cuatro controles primarios del método para la determinación de resistencia Isoniacida y Rifampicina mediante cambios de temperatura de disociación. Los resultados de esta estandarización reflejaron que el método utilizado puede ser optimizado en rendimiento de reactivos y tiene una concordancia mayor al 80 % en el caso de Rifampicina, y más de 90% en el caso de Isoniacida en comparación con los datos fenotípicos. El método estandarizado disminuye el tiempo de detección de tuberculosis y permite obtener perfiles de resistencia a los principales antituberculosos de primera línea.

PALABRAS CLAVE

Tuberculosis multidrogoresistente, PCR en tiempo real, Curvas melting.

and primary controls of the method for the determination of resistance Isoniacida and Rifampicina by changes of temperature of dissociation were used.

The results of this standardization showed that the method used can be optimized in reagent performance and correlates more than 80% with phenotypic results. The standardized method improves the time detection of tuberculosis and allows to obtain resistance profiles to the main first-line antituberculosis drugs.

KEY WORDS

Multidrug-Resistant Tuberculosis, Real Time PCR, Melting Curves.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa, causada por diversas especies del *Complejo Mycobacterium tuberculosis*. Ésta enfermedad es la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas alrededor del mundo sólo después de la infección por VIH.

Se ha estimado que una tercera parte de la población está infectada, por lo que continúa siendo una amenaza grave para la salud pública, principalmente por el surgimiento de cepas Multidrogoresistentes (MDR-TB) que son cepas que presentan resistencia a Rifampicina e Isoniacida, que constituyen la columna vertebral del tratamiento antituberculoso, ya que en el tratamiento se estandarizó cuatro drogas, Rifampicina (RIF), Isoniacida (INH), Etambutol (EMB) y Pirazinamida (PZA), que se utilizan durante la primera fase de dos meses (llamada intensiva), la cual se continúa con una segunda fase de cuatro meses donde también se utiliza Isoniacida y Rifampicina. (Peñata y cols., 2016)

Dado el valor terapéutico de ambos antibióticos, fueron las primeras drogas cuyos mecanismos de acción y de resistencia fueron estudiados a nivel molecular, esto ha permitido el estudio de los genes más frecuentemente afectados por mutaciones, los cuales han sido validados al ser detectadas en cepas clínicas resistentes a estas drogas.



Bolivia se ubica entre los 10 países latinoamericanos con los índices más altos de tuberculosis (TB) y multidrogoresistencia (MDR) y aunque la TB es una enfermedad infecciosa prevenible y curable, la lucha contra la resistencia a los fármacos antituberculosos es un nuevo desafío a nivel mundial pero en particular y de manera especialmente en países como el nuestro donde los últimos estudios sobre TB-MDR tiene un aumento de 0,2% por año, desde el año 2004 que se encontró un 1,5% de MDR, el año 2005 1,7%, para el año 2012 3,1% de MDR. (Molina, 2011)

Si bien en la actualidad se aplican métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes, para el diagnóstico de este agente infeccioso, en nuestro medio no existen trabajos acerca de la aplicación de estos métodos para la detección precisa y efectiva de cepas MDR-TB. Esto se constituye en un problema ya que el diseño de estrategias de diagnóstico y estudios de susceptibilidad a drogas que permita tener resultados inmediatos es muy necesario para el control de esta enfermedad, ya que en la actualidad el "Gold Standar" es el cultivo y la posterior determinación de perfiles de resistencia que implican 60 días o más, tiempo en el cual el paciente puede abandonar el tratamiento e incluso paciente puede fallecer.

El conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos de resistencia a los antituberculosos provee información de gran valor para el manejo del paciente en varios aspectos. El Análisis genético de los microorganismos acorta el periodo de reporte de susceptibilidad a drogas, particularmente las de primera línea, con la finalidad de aportar un esquema terapéutico acertado y oportuno logrando la cura del paciente, lo que se traduce en una disminución en la transmisión del patógeno y la propagación de cepas multidrogorresistentes. Además puede brindar información sobre la capacidad de virulencia de una cepa y representar una pauta para el diseño de nuevas drogas o vacunas.

La Rifampicina actúa inhibiendo la síntesis de ARN mensajero, a cargo de la ARN polimerasa. Asimismo, las cepas mutantes adquieren resistencia a RIF mediante mutaciones en el gen *rpoB*, gen codificante para la subunidad beta de la ARN polimerasa. Se describió que las mutaciones se debían puntualmente a inserciones y deleciones que afectan una región de 100 pb esto casi en el 95% de los casos estudiados. (Molina, 2011)

La Isoniacida es una pro droga que con la ayuda de la enzima catalasa peroxidasa codificada por el gen *katG*, adquiere la forma hidracida del ácido isonicotínico que es la forma de esta droga de gran actividad sobre *M. tuberculosis*, inhibe específicamente la síntesis de los ácidos micólicos, que constituyen uno de los componentes principales de la envoltura de la célula micobacteriana y contribuyen, en gran medida, a su impermeabilidad. La mutación más observada en *katG* es en el codón 315, que causa el cambio del aminoácido Serina 315 por Treonina y estas mutaciones son las responsables de la resistencia en la gran mayoría de los casos. Sin embargo, existe otro gen blanco de acción para la resistencia a la Isoniacida que es el gen *inhA*, gen que participa activamente para la síntesis de ácidos grasos de cadena corta y cadena larga de *M. tuberculosis* y otras Mycobacterias. Pero que según estudios

realizados sobre cepas que presentan resistencia a este fármaco tiene más de una sola región en la que pueden existir mutaciones que conducen a la resistencia. (De La Iglesia, 2006 y Molina, 2011)

La PCR en tiempo real (qPCR) o también llamada PCR cuantitativa permite realizar simultáneamente la amplificación y la cuantificación del ADN amplificado, el fundamento es la utilización de primers marcados con fluoróforos que emiten fluorescencia al ser estimulados por un haz de luz a determinada longitud de onda, que en el presente estudio permite el análisis de mutaciones cromosomales en nuestro agente infeccioso en estudio. Una de las aplicaciones de este es el análisis de curvas Melting o curvas de disociación, el análisis de estas curvas se realiza en los productos ya amplificados, y se basa en fijar distintas temperaturas a los amplicones para obtener una gráfica de la cinética de disociación, con el fin de determinar el valor del "Tm" (temperatura Melting) que expresa la temperatura a la cual el 50% de la molécula de ADN está desnaturalizada. El valor del Tm es característico para cada secuencia ya que está en función de la composición y el tamaño de la molécula. (Costa, 2004 y De Hoyos, 2009)

El presente estudio pretendió: Estandarizar la técnica PCR en Tiempo Real por Análisis de Curvas Melting para la determinación del perfil de susceptibilidad a antituberculosos de primera línea de *Mycobacterium tuberculosis*, valiéndonos en hecho de que la resistencia a estos fármacos se da por mutaciones en el cromosoma del bacilo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El componente práctico del trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

1. **Recolección de las muestras:** Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* fueron obtenidas del laboratorio de Referencia Nacional de Diagnóstico de Tuberculosis "INLASA", previamente caracterizadas fenotípicamente en cultivo en medio sólido Lowenstein Jensen, Stronebrink, con determinación del perfil de susceptibilidad a los antituberculosos de primera línea por el método de proporciones Cannetti Rist y test de Nitrasa.
2. **Tamaño muestral:** Para la estandarización de este método se trabajó con once cepas que expresan perfiles de susceptibilidad variados y provienen de distintas regiones del país. Además de trabajar también con dos controles positivos y dos controles negativos de procedencia interna al método.
3. **Extracción de material genético:** Se utilizó el método de extracción por columnas de Sílice, método que incluye extracción y purificación de ADN cromosomal de la marca "Invitrogen lifetechnologies".
4. **Montaje de la PCR para el test de Mutación:** Para el análisis del perfil de susceptibilidad se utilizó el Kit comercial "*Mycobacterium tuberculosis* Resistance Mutation test de la línea QUANDX" (Quandx, 2018).

Para cada cepa o control positivo se trabajó en ocho tubos diferentes, de los cuales cuatro se utilizaron para la determinación de resistencia a la Isoniacida, y cuatro para determinar la resistencia a Rifampicina. El kit comercial presenta dos Mix diferentes para cada uno de los antituberculosos, y cada Mix se trabajó con dos canales de fluoróforos diferentes. El canal FAM (520nm) y el canal JOE (550nm).

En la determinación de susceptibilidad se valoró el cambio o variación en el "Tm" (temperatura de disociación) por 2 °C o más, esto sobre las moléculas diana "targets", en el caso de la Isoniacida: en la región promotora del gen *ahpC*, codón 94 del gen *inhA*, y el codón 315 del gen *katG*. En el caso de Rifampicina: en los codones 507 y 533 del gen *rpoB*. En un termociclador "FAST-7500" de AppliedBiosystem.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Todos los controles internos del kit comercial utilizado, cumplieron con los parámetros señalados por la bibliografía, los valor del Tm obtenidos se reflejan en la Tabla 1. En la cual se compara el valor obtenido en el experimento junto al valor estándar establecido por el kit comercial. Los controles negativos no figuran en la tabla ya que estos no amplificaron en la primera parte del experimento, como se esperaba.

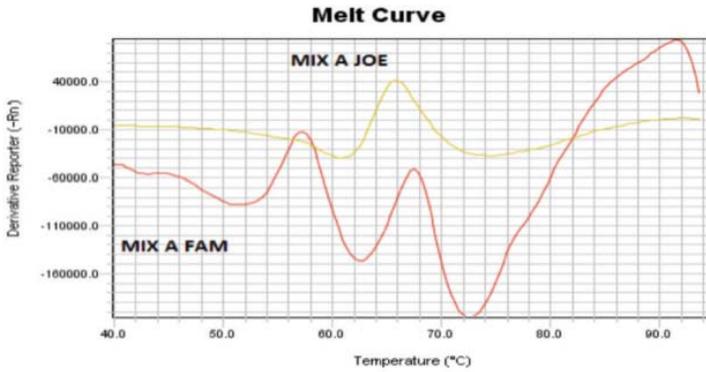
Tabla 1. Comparación temperaturas Melting (Tm) esperadas según la bibliografía vs. Valores obtenidos en el laboratorio. De cepas control, sensibles o wild type

FÁRMACO	MIX	CANAL	Nº PICOS	TM "WT" ESPERADO	TM CONTROL 1	TM CONTROL 2
ISONIACIDA	A	FAM	2	57 A 59 °C	57,19 °C	57,5°C
		JOE	1	68 A 70 °C	68 °C	68,02°C
	B	FAM	1	65 a 67 °C	65,71°C	66,74°C
		JOE	1	63 A 65 °C	63,08°C	63,24°C
RIFAMPICINA	A	FAM	1	67 A 69 °C	67,53°C	68,06°C
		JOE	1	65 A 67 °C	66,76°C	67,01°C
	B	FAM	1	73 A 75 °C	75°C	74,85°C
		JOE	1	64 A 66°C	64,64°C	65,2°C
		JOE	1	66 A 68 °C	66,08°C	66°C

Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, 2018.

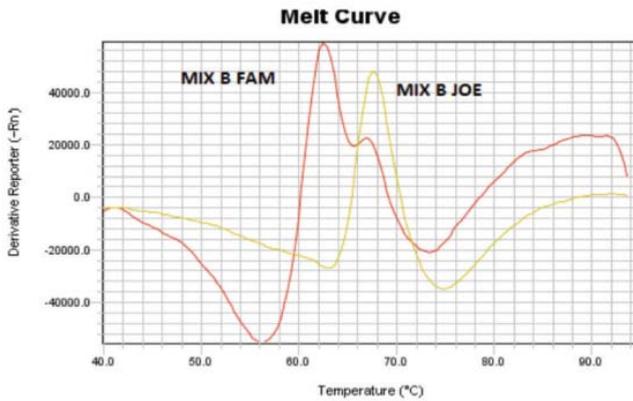
En las siguientes gráficas se observa las curvas obtenidas de los controles positivos internos, que presentan el diseño característico de la curva Melting, para una cepa sensible o "wild type" a los diferentes fármacos y según los distintos fluoróforos utilizados

Gráfica 1. Curvas Melting para prueba de susceptibilidad a Isoniacida, de cepas control (wild type) según floróforo utilizado, Mix A



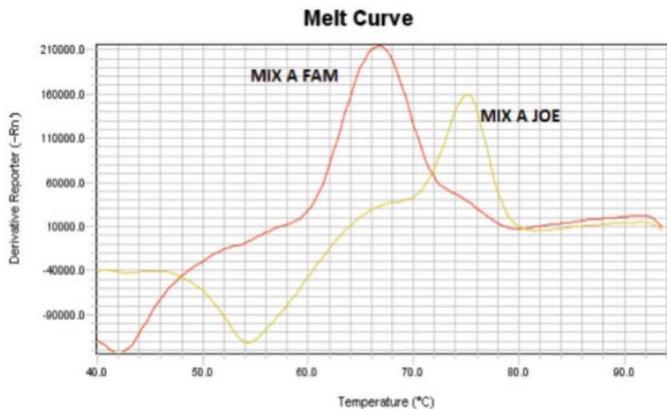
Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, 2018.

Gráfica 2. Curvas Melting para prueba de susceptibilidad a Isoniacida, de cepas control (wild type) según floróforo utilizado. Mix B



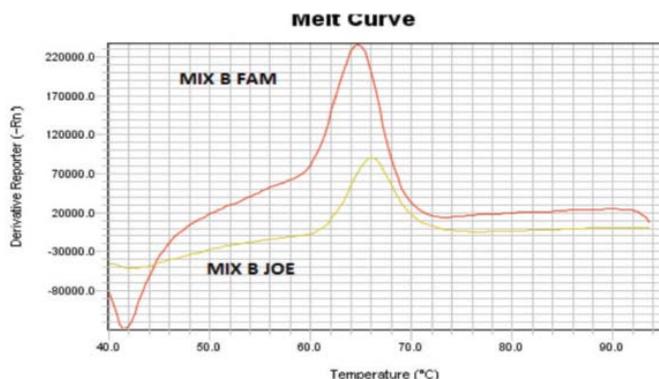
Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, 2018.

Gráfica 3. Curvas Melting para prueba de susceptibilidad a Rifampicina, de cepas control (wild type) según floróforo utilizado. Mix A



Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, 2018.

Gráfica 4. Curvas Melting para prueba de susceptibilidad a Rifampicina, de cepas control (wild type) según fluoróforo utilizado. Mix B



Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, 2018.

En el trabajo con cepas, se evaluó el método de extracción, con el fin de conocer si este permitiría que haya mayores inconvenientes o interferencias en la amplificación del material genético, además se realizó evaluación sobre una de la programación de la corrida de PCR, en cuanto al número de ciclos y tiempos de los mismos que sugería el protocolo interno del kit comercial para evidenciar si eran adecuados y se adaptaban a las condiciones del equipo utilizado y nuestro medio ambiente. La única modificación en el protocolo fue el de ampliar el tiempo de lectura de amplificación de 15 segundos (sugerido por el kit) a 30 segundos esto por una condición propia de equipo utilizado.

Al analizar los resultados se pudo observar que el protocolo y los métodos utilizados permitieron un desarrollo correcto del experimento, en un porcentaje mayor al 90% ya que sólo una muestra de las once utilizadas, no amplificó, la razón de dicho resultado no pudo ser evidenciada. Se observó que las moléculas o genes blanco se adaptaban a Mycobacterias propias de nuestro medio y con distintos perfiles de resistencia a antituberculosos.

En la Tabla 2 se observa los valores del T_m (expresados en grados centígrados, obtenidos en el experimento, en relación con los parámetros estándar que indica el kit comercial. Estableciendo el perfil de resistencia obtenido por esta metodología, en base al criterio de consideración a una cepa como resistente si esta presenta un T_m menor al del control positivo en 2°C o más. Esto no aplica a T_m superior al del control positivo ya que las principales mutaciones en los genes relacionados a la resistencia a los antituberculosos se deben a deleciones de bases en las secuencias de estos genes (Coscolla, 2014). Lo cual lleva a que el valor del T_m descienda ya que se cuenta con una secuencia de menor tamaño. La comparación de los resultados fenotípicos versus los genotípicos obtenidos por PCR en tiempo real por análisis de curvas Melting, en cuanto al perfil de susceptibilidad a los antituberculosos de primera línea se observan en la Tabla 3.

Tabla 2. Temperaturas Melting obtenidas en el procedimiento, en relación con los parámetros estándar que indica el kit comercial expresadas en grados centígrados e interpretación del perfil de resistencia por método genotípico.

COD.	ISONIACIDA						RIFAMPICINA						RESISTENCIA ISONOACIDA	RESISTENCIA RIFAMPICINA
	MIX A			MIX B			MIX A			MIX B				
	CANAL		JOE	CANAL		JOE	CANAL		JOE	CANAL		JOE		
	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE		
WT	57 A 59	65 a 67	63 A 65	67 A 69	65 A 67	73 A 75	64 A 66	66 A 68	S				S	
	68 A 70													
1	57,89	66,46	63,77	63,24	68,86	75,53	66,63	66,63	R				R	
	68,01													
2	58,54	66,81	64,84	64,84	sin pico	sin pico	67,88	72,35	R				R	
	68,51													
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-	
	-													
4	57,89	66,46	63,77	68,42	68,24	75,15	65,74	66,13	S				S	
	67,79													
5	57,66	66,27	63,41	63,95	67,53	75,75	60,55	66,1	R				R	
	67,61													
6	58,68	67,19	64,49	69,67	64,31	64,13	64,82	73,42	S				R	
	69,04													
7	59,71	68,09	sin pico	64,87	68,52	74,84	70,08	68,63	R				S	
	70,06													
8	58,88	66,66	63,8	68,45	68,69	74,67	67,5	67,38	S				S	
	68,99													
9	58,33	66,46	57,89	67,38	68,63	74,89	66,66	66,84	R				S	
	68,45													
10	58,4	66,48	63,44	68,89	67,63	74,89	66,3	66,66	S				S	
	68,63													
11	60,6	68,27	63,4 °C	70,24	66,84	67,02	66,55	60,52	R				R	
	70,78													

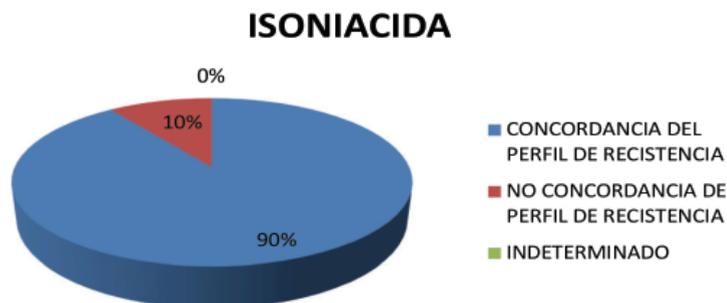
Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, 2018.

Tabla 3. Comparación de los resultados fenotípicos obtenidos por cultivo en medio Lowestein Jensen, Stronebrink versus resultados genotípicos obtenidos por análisis de Curvas Melting

MUESTRA	AMPLIFICACIÓN	CONCENTRACIÓN	CULTIVO		CURV. MELT.	
		ng/uL	INH	RIF	INH	RIF
Cepa-1	SI	32	R	R	R	R
Cepa-2	SI	52	R	R	R	R
Cepa-3	NO	3	S	R	/	/
Cepa-4	SI	18	S	S	S	S
Cepa-5	SI	72	R	S	R	R
Cepa-6	SI	114	S	S	S	R
Cepa-7	SI	32	R	R	R	R
Cepa-8	SI	29	R	R	R	R
Cepa-9	SI	36	R	S	R	S
Cepa-10	SI	22	R	S	S	S
Cepa-11	SI	78	R	R	R	R

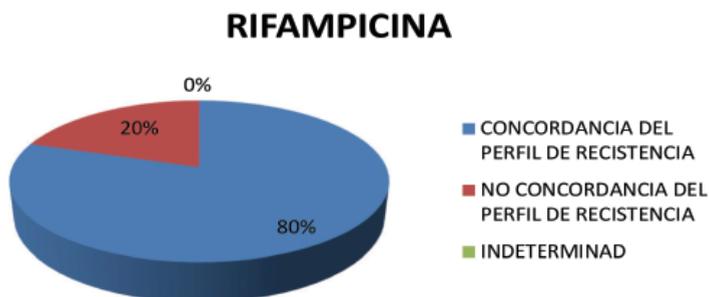
Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, 2018.

Gráfica 5. Concordancia del perfil de susceptibilidad a Isoniacida entre método de Análisis De Curvas Melting y el Gold Estándar (cultivo) expresado en porcentaje



Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, 2018.

Gráfica 6. Concordancia del perfil de susceptibilidad a Rifampicina entre el método de análisis de Curvas Melting y el gold estándar (cultivo) expresado en porcentaje



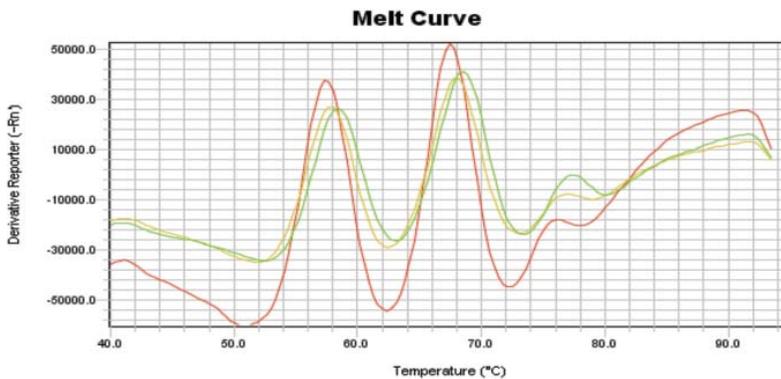
Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, 2018.

Como se puede observar en la Tabla 3 y las Gráficas 5 y 6 existe una concordancia del 90% en los perfiles de resistencia fenotípicos y genotípicos para la Isoniacida, mientras que una concordancia del 80% entre los perfiles fenotípicos y genotípicos de Rifampicina. Y además se puede observar que la concentración de ADN no influyó en los resultados obtenidos.

En las siguientes gráficas se observan ejemplos de curvas Melting típicas de una cepa sensible y otras de cepas resistentes. Los picos y los diseños de las curvas de cepas sensibles presentan gran similitud en función de la curva del control positivo o cepa wild type (Gráfica 7), a diferencia de las cepas resistentes que presentan curvas con picos diferentes al del control positivo tanto en posición del pico más alto, como en la forma de la curva (Gráfica 8).

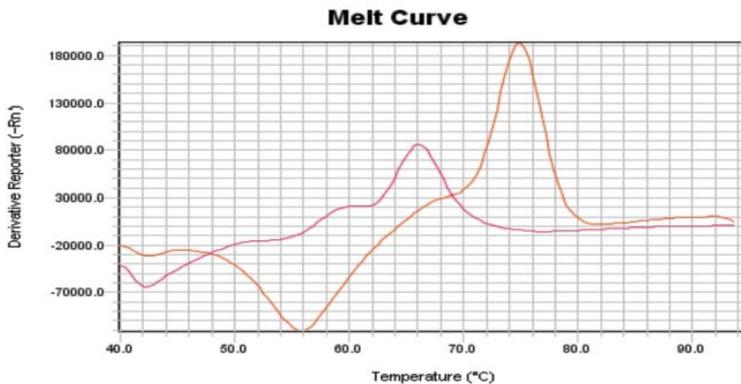
En algún momento se puede dar la presencia de cepas heterogéneas (mezcla de más de un tipo de colonia), que presentarían curvas atípicas, sin embargo en esta etapa de estandarización no se presentó ninguna.

Gráfica 7. Ejemplo de Curvas Melting características de cepas sensibles (en color verde y amarillo) en función del control positivo (en color rojo)



Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, 2018.

Gráfica 8. Ejemplo de Curvas Melting características de cepas resistentes (violeta) en función del control positivo (rojo)



Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, 2018.

CONCLUSIONES

El método estandarizado es efectivo no solo para mejorar el tiempo de detección de tuberculosis sino además por la ventaja de obtener simultáneamente el perfil de resistencia a los principales antituberculosos de primera línea.

Los resultados obtenidos de esta estandarización reflejaron que el método utilizado puede ser optimizado en un 100% ya que se comprobó que se puede utilizar la mitad de volumen de "MIX de PCR" y enzima del establecido en el inserto adjunto al kit de reacción utilizado.

En la actualidad se está trabajando en la validación de este método, como parte del proyecto "Identificación de perfiles genéticos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Bolivia para contribuir al control de la Tuberculosis" Financiados con recursos IDH de la Universidad Mayor de San Andrés.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Coscolla, M. y Gagneux S. (2014) "Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*" Revista Seminars in Immunology. Volumen 26 pp. 431-444
- Costa, J. (2004) "Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real" Enfermedades Infecciosas en Microbiología Clínica. Volumen 22 (5) pp. 299-305. Disponible en: <http://www.elsevier.es, day 20/03/2018>.
- De Hoyos, V. (2009) Métodos para la caracterización Fenotípica y genotípica de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los antimicrobianos. (Tesis de grado) Facultad de Ciencias-Bacteriología- Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia
- De La Iglesia, A. I. y Morbidoni, H. R. (05/06/2006) "Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos" Revista Argentina de Microbiología. Volumen 38, pp. 97-109.
- Molina, J. (2011) Validación de la Genotipificación como prueba para el diagnóstico y determinación de resistencia a rifampicina e isoniacida en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes en Bolivia (Tesis de grado) Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas – Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
- Noticias científicas (2018) "Melting" Últimas noticias científicas. Estados Unidos. Disponible en: <http://www.noticiascientificas.info/2011/07/melting.html>
- Peñata, A. Salazar, R. Castaño T, et al. (2016) "Diagnóstico molecular de tuberculosis extrapulmonar y sensibilidad a rifampicina con un método automatizado en tiempo real" Revista Biomédica. Volumen 36 (1) pp. 78-89. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3088>
- QuanDx. (2018). *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DRUG-RESISTANT Mutation Test Kits. California. Disponible en: <http://www.quandx.com/infectious-diseases/tb-drug-resistant-mutation-test-kits/>
- Rodríguez, M y Rodríguez, W. (2006) PCR en tiempo real, Métodos Físico Químicos en Biotecnología. México. Instituto de Biotecnología-UNAM.

