

Ensayo de curvas de fusión de alta resolución para la detección de resistencia a rifampicina en *Mycobacterium tuberculosis*

Parra Murillo, Ana Juliana¹, Tovar Aguirre, Olga Lucía², Siller López, Fernando³

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis multidrogoresistente (TB-MDR) está definida como la resistencia a la isoniacida y rifampicina (RIF). La identificación de TB-MDR se puede realizar por medio de PCR tiempo real asociado con análisis de fusión de alta resolución (HRMA) el cual permite la detección de variaciones en la secuencia de DNA mediante cambios en las curvas de fusión de fluorescencia de los productos amplificados de DNA. Por su practicidad y rapidez de implementación, esta técnica ha sido usada para el monitoreo de perfiles de cepas resistentes y cepas sensibles del gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*, gen en la que reside la mayoría de las mutaciones responsable de la resistencia a rifampicina.

OBJETIVO

Identificar los perfiles de las curvas de fusión de cepas resistentes y cepas sensibles del gen *rpoB* de *M. tuberculosis*.

METODOLOGÍA

Se tomaron colonias *M. tuberculosis* positivas, se inactivaron a 80° por una hora y se realizó la extracción de DNA para posteriormente amplificar por qPCR-HRMA una secuencia de 81 pb del gen *rpoB*.

-
- 1 Semillero de enfermedades infecciosas (SIDEIN). Universidad Católica de Manizales
 - 2 Grupo de Investigación de Enfermedades infecciosas (GINEI). Universidad Católica de Manizales.
 - 3 Grupo de investigación Microbiotec. Universidad Libre, seccional Pereira. *Grupo de Investigación de Enfermedades Infecciosas (GINEI). Universidad Católica de Manizales (fsiller@ucm.edu.co)*

RESULTADOS

En el ensayo se obtuvieron perfiles de curvas de fusión para doce aislamientos, un perfil resistente a RIF considerado como control positivo, nueve aislamientos presentaron curvas variantes y dos aislamientos no amplificaron.

CONCLUSIÓN

Si bien el perfil de la curva de fusión es capaz de detectar variaciones en una secuencia de DNA de interés, se requiere validar los ensayos del HRMA con un mayor número de muestras y con una secuenciación del genoma y su comparación con una secuencia de referencia.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, rpoB, rifampicina, qPCR-HRMA.

Highresolution melting curve assay for the detection of resistance to rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*

INTRODUCTION

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is defined as resistance to isoniazid and rifampicin (RIF). The identification of MDR-TB can be carried out by means of real-time PCR associated with high-resolution melting analysis (HRMA) which allows the detection of variations in the DNA sequence through changes in the fluorescence melting curves of the products. amplified DNA. Due to its practicality and speed of implementation, this technique has been used to monitor the profiles of resistant strains and sensitive strains of the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*, a gene in which most of the groups responsible for resistance to rifampicin reside.

OBJECTIVE

To identify the melting curves profiles of resistant and sensitive strains of the *rpoB* gene of *M. tuberculosis*.

METHODOLOGY

Positive *M. tuberculosis* colonies were taken, inactivated at 80° for one hour and DNA extraction was performed to later amplify by qPCR-HRMA an 81 bp sequence of the *rpoB* gene.

RESULTS

In the assay, melting curve profiles were obtained for twelve isolates, a profile resistant to RIF considered as a positive control, nine isolates presented curve variants and two isolates did not amplify.

CONCLUSION

Although the profile of the melting curve can detect variations in a DNA sequence of interest, it is necessary to validate the HRMA assays with a larger number of samples and with a genome sequencing and its comparison with a sequence of reference.

Key words. *Mycobacterium tuberculosis*, *rpoB*, rifampin, qPCR-HRMA.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa, causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Según la Organización Mundial de la Salud, Colombia en el año 2017 notificó 13.870 casos de tuberculosis y 600.000 nuevos casos de resistencia a rifampicina¹. En el Departamento de Caldas fueron notificados 21.9 casos de tuberculosis por cada 100.000 habitantes². La interacción entre el microorganismo y los antibióticos antituberculosos desarrollaron mecanismos de evasión que no permiten la acción eficiente de los antibióticos³, la resistencia genética a un medicamento antituberculoso se debe a: mutaciones cromosómicas de repeticiones de micobacterias, la prescripción médica inadecuada, dosis erróneas y la pobre adherencia al tratamiento por parte de los pacientes.⁴ La tuberculosis multidrogoresistente (TB-MDR) está definida como la resistencia a la isoniazida (INH) y rifampicina (RIF) antibióticos de primera línea del tratamiento para la tuberculosis. El mecanismo de acción de la rifampicina interfiere con la transcripción y elongación del ARN al unirse a la subunidad β de la ARN polimerasa, las cepas RIF de *M. tuberculosis* poseen alteraciones dentro de un fragmento de 81 pb, la llamada región determinante de Rifr (RRDR), del gen *rpoB*⁵

El diagnóstico microbiológico para la tuberculosis se puede realizar por métodos convencionales en los cuales

se incluye el cultivo, considerado el estándar de oro y métodos de biología molecular para la amplificación de ácidos nucleicos, obteniendo diagnósticos precisos y rápidos. El bacilo tuberculoso es un microorganismo de crecimiento lento, además que requiere de un número mínimo de 10^4 bacilos en la muestra para ser cultivado⁶, las muestras se inoculan en medios líquidos o sólidos y se controlan durante varias semanas hasta la detección del crecimiento de micobacterias, esto dificulta su aislamiento en pacientes paucibacilares e impide su diagnóstico precoz⁷.

Las pruebas de susceptibilidad a los medicamentos utilizando técnicas moleculares pueden mejorar la identificación de *M. tuberculosis* resistente a los medicamentos y aportar un diagnóstico rápido, la secuenciación de DNA basada en PCR de genes relacionados con la resistencia a fármacos es probablemente el método más rápido y específico para la identificación de mutaciones. Sin embargo, debido al alto costo de la secuenciación no está ampliamente disponible⁸. La PCR en tiempo real (qPCR) es una técnica utilizada para amplificar y cuantificar el DNA, la principal ventaja de qPCR es la velocidad en la obtención de resultados, (1.5–2.0 h) después de la extracción de DNA, y el menor riesgo de contaminación debido a que tanto la reacción como la detección ocurren en un solo tubo⁹ y con capacidad de identificar la resistencia a la rifampicina por medio del análisis de alta fusión

de resolución (HRMA, por sus siglas en inglés High Resolution Melt Analysis), el cual permite la detección de variaciones en la secuencia de DNA como mutaciones o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), mediante cambios en los perfiles de curvas de fusión de los productos amplificados de DNA.¹⁰ Por su practicidad y rapidez de implementación, esta técnica ha sido usada para análisis de metilación, escaneo de mutaciones genotipificación de amplicones, y monitoreo de perfiles de cepas resistentes y cepas sensibles del gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*¹¹ El objetivo del presente estudio fue identificar los perfiles de las curvas de fusión de cepas resistentes y cepas sensibles del gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis* mediante qPCR-HRMA para valorar la inclusión de la prueba como potencial apoyo diagnóstico de la enfermedad y la resistencia a rifampicina.

METODOLOGÍA

Para realizar el ensayo el Laboratorio de Salud Pública, Dirección Territorial de Salud Caldas proveyó cultivos positivos para tuberculosis procedentes de diferentes centros de salud del Departamento de Caldas. El Instituto Nacional de Salud realizó un análisis para la identificación de cepas resistentes y cepas sensibles por medio de la técnica Bactec MGIT 960.

Extracción de DNA *Mycobacterium tuberculosis*

Se tomaron colonias de cultivos Ogawa Kudoh de seis a ocho semanas de crecimiento, se inactivaron a 80°C durante una hora en baño seco, se centrifugaron a 15,000 rpm durante 5 minutos, y en el sobrenadante obtenido se realizó la extracción de DNA mediante columnas de intercambio iónico siguiendo las instrucciones descritas por el proveedor (Isolate II Blood DNA. Bionline, Londres, UK). La calidad y cantidad del DNA obtenido fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría en un equipo Nanodrop (ThermoFisher, Carlsbad, CA).

PCR tiempo real asociado a Análisis de Alta Fusión de Resolución

La mezcla de PCR se preparó de acuerdo con lo reportado por Chen y Cols¹⁰, utilizando 2,0 µl de DNA, 5 µl del sistema SensiFAST HRMA, incluyendo hot-start DNA polimerasa termo-estable y el colorante EvaGreen, 0,125 µM de primer específico para el gen *rpoB* (Fw 5'-TCGCCGCGATCAAGGAGTT-3' y Rv 5'-GTGCACGTCGCGGACCTC-3') y agua destilada estéril, que se agregó para obtener un volumen total de 10µl. La amplificación se realizó en un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Germantown, MD) con una

desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 30s y 70°C durante 40 minutos, y 72 ° C durante 45 s y un alargamiento final a 72 ° C durante 10 min.

Para el HRMA se realizó una segunda incubación a 60°C durante 70 s, para permitir la recuperación del DNA. El análisis se desarrolló de 70°C a 95°C, obteniendo los perfiles en incrementos 0,2°C durante 2 s en cada paso.

La curva HRMA se analizó utilizando el software Rotor-gene ScreenClust (Qiagen). Las gráficas de temperatura diferencial se generaron convirtiendo el perfil de fusión de tipo silvestre en

una línea horizontal y normalizando los perfiles de fusión de las muestras examinadas con respecto al perfil de tipo resistente.¹⁰

RESULTADOS

La amplificación del gen de *rpoB* de 81 bp de la región determinante para resistencia a rifampicina se realizó por qPCR-HRMA por triplicado en 12 cepas de *M. tuberculosis* obtenidas de la Dirección Territorial de Salud de Caldas. Posterior al qPCR-HRMA los amplicones generados se sometieron a corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 2% para verificar la correcta amplificación del gen (Figura 1).

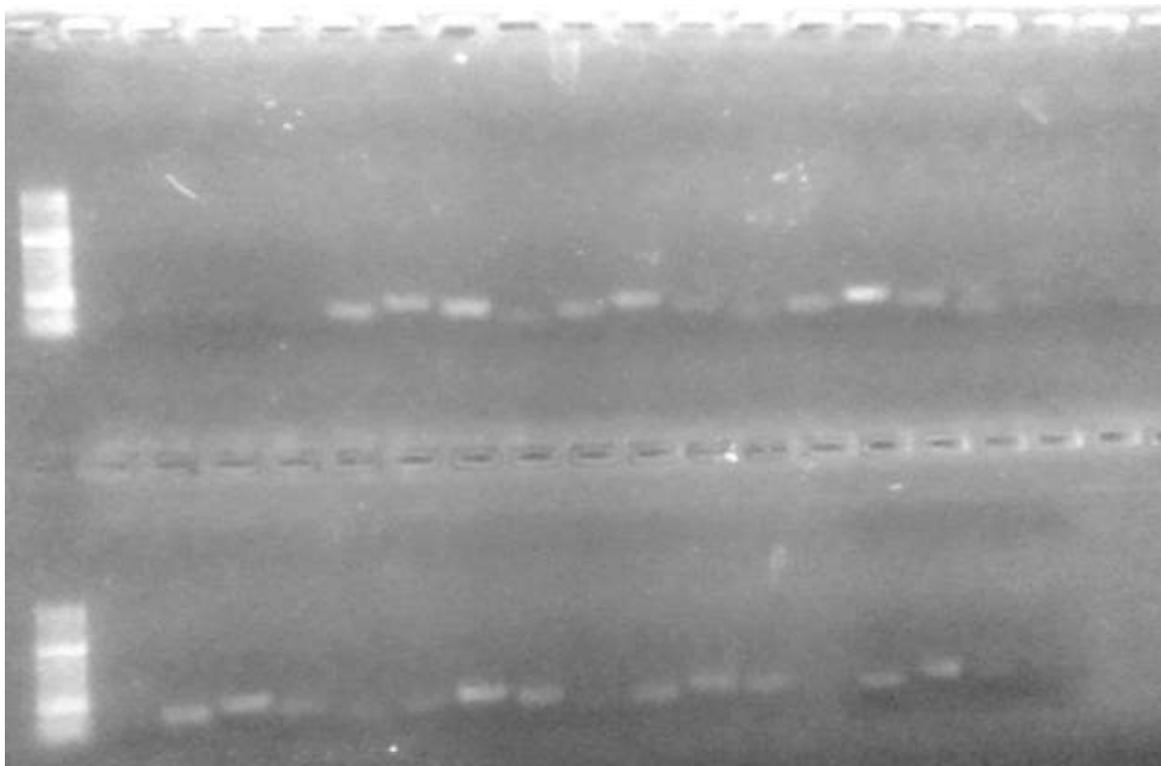


Figura 1. Amplicones del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* en electroforesis al 2% agarosa

En el ensayo se obtuvieron perfiles de curvas de fusión para doce aislamientos, un perfil resistente considerado como control positivo, nueve aislamientos presentaron curvas variantes con respecto al control y dos aislamientos no amplificaron.

En la Figura 2 se presenta la curva en estado normal en función de fluorescencia y temperatura. Las curvas de fusión variante son particularmente claras en el gráfico (Fig 1-B) que considera como referencia a una cepa resistente a RIF analizada por cultivo microbiológico.

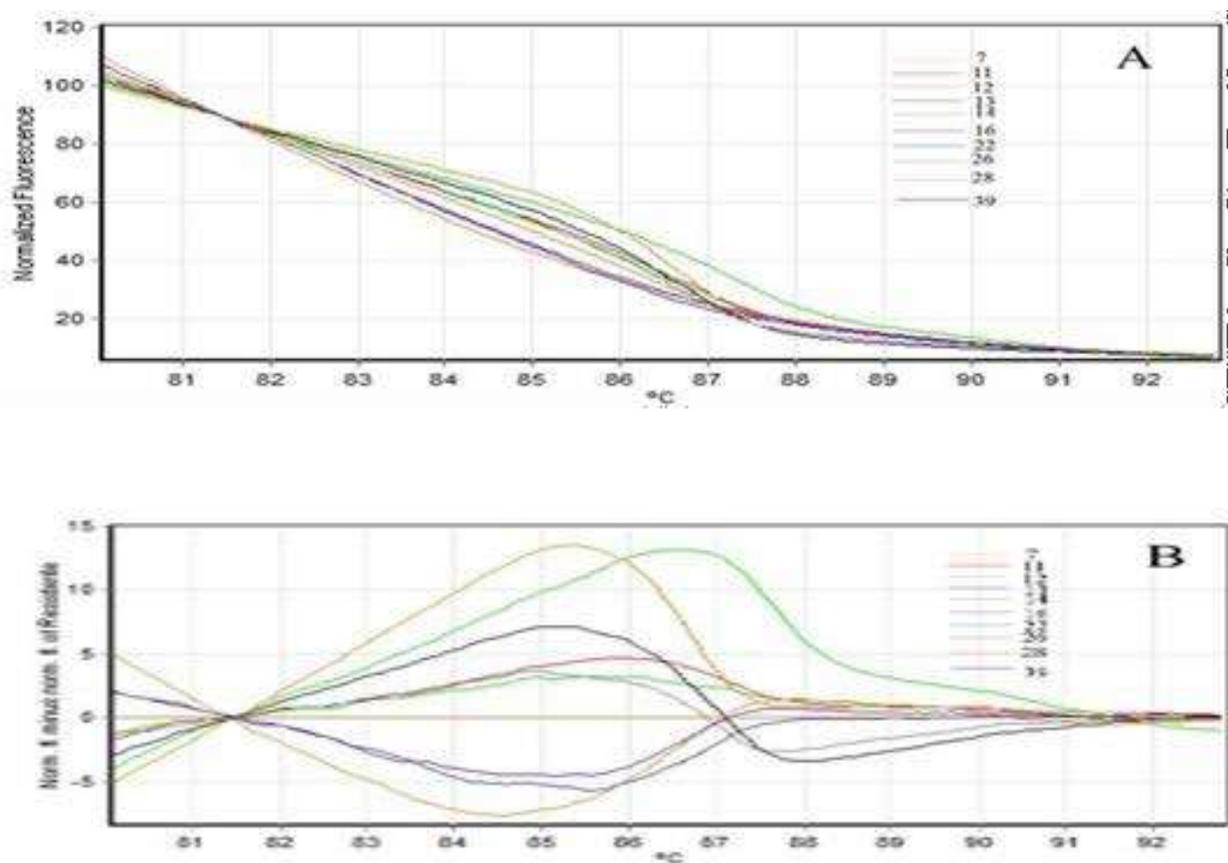


Figura 2. (A) Gráfico de diferencia normalizado, con variación en la temperatura. (B) Gráfico con variación de temperatura por alteración en el perfil del gen *rpoB*. La línea base representa *M. tuberculosis* un perfil de RIF-resistente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio, se desarrolló un ensayo de HRMA mediante el uso de PCR en tiempo real para la identificación de perfiles de curvas de fusión de cepas resistentes del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* en doce aislamientos clínicos, uno de ellos considerado como control positivo debido a que previamente fue identificado fenotípicamente como resistente a RIF. Se observaron variaciones con respecto al perfil del control, aunque para validar los ensayos se requiere de un mayor número de muestras con un conocimiento fenotípicamente previo y de la secuenciación del genoma.^{10,11}

El ensayo HRMA es una técnica molecular que proporciona un análisis cuantitativo de la curva de fusión de un fragmento de DNA después de la qPCR, por lo cual facilita la detección de cambios en los perfiles del gen *rpoB* el procedimiento puede tardar 1.5 a 2 h. Es un sistema simple de tubo cerrado, que reduce el riesgo de contaminación. Las variantes se identifican fácilmente

porque distorsionan la forma de la curva de fusión en comparación con la de tipo silvestre, no requiere sondas fluorescentes costosas o reactivos especializados, es un método novedoso, rápido y sensible para detectar mutaciones genéticas asociadas con la resistencia a los medicamentos de *M. tuberculosis*¹¹ El HRMA es una técnica molecular para la detección de TB-MDR que tiene como ventaja los diagnósticos rápidos, sensibles y específicos, lo cual ayudarían al diagnóstico temprano y tratamiento oportuno de los pacientes con tuberculosis multidrogeresistente.

Sin embargo, el análisis de alta resolución de fusión no puede detectar la resistencia al fármaco conferida por mecanismos desconocidos puesto que la base genética de la resistencia aún no se comprende completamente, y esta limitación es común entre todas las técnicas basadas en la secuenciación del ADN. Por lo tanto es posible que no pueda reemplazar completamente la prueba de sensibilidad a los medicamentos (DST, por sus siglas en inglés) basado en el cultivo convencional.¹¹

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Tuberculosis country profiles. [Internet] Disponible en: https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=/WHO_HQ_Reports/G2/PROD/EXT/TBCountryProfile&ISO2=CO&outtype=html&LAN=ES, acceso enero 2019.
2. Instituto Nacional de Salud. Boletín año 2017. [Internet] Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Tuberculosis%202017.pdf>, acceso enero 2019
3. Rodríguez LA, Concepción LA, Gónzales LD, Alquizas O, Guerra JC, Gamarra ER, et al Patrones de resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea en la región La Libertad Perú. *SCIÉENDO*, 2012, 15 (1): 75-80.
4. Zhang Y. Diagnóstico de tuberculosis resistente a medicamentos: confiabilidad y rapidez en la detección *Artículos vanguardistas*, 2009, 13 (11):1320-1330.
5. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung Disease*, 1998, 79 (1): 3- 29.
6. Ortiz DC, Aristizábal BH. Métodos diagnósticos moleculares en tuberculosis. *MEDICINA U.P.B*, 2013, 32 (2): 144-150
7. McNERNEY R, Maeurer M, Abubakar I, Marais B, McHugh TD, Ford N, et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. *J Infect Dis*. 2012 15 (205)147-158.
8. Go Eun C, Sun Min L, Jongyoun Y, Sang Hyun H, Hyung HK, Eun Yup L, et al. High Resolution Melting Curve Analysis for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *Journal of clinical microbiology*, 2010, 48 (11): 3893-3898.
9. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *Federation of European Microbiological Societies*, 2009, 9 (1): 1-9.

10. Chen X, Kong F, Wang Q, Li C, Zhang J, Gilbert GL. Rapid detection of isoniazid, rifampin, and ofloxacin resistance in mycobacterium tuberculosis clinical isolates using high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol.* 2011;49(10):3450–7.
11. Nagai Y, Iwade Y, Hayakawa E, Nakano M, Sakai T, Mitarai S, et al, High resolution melting curve assay for rapid detection of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Chemother.* 2013,(19):1116–1125.