

# Identificación rápida de mutaciones puntuales en el gen *KatG* (Catalasa-Peroxidasa) en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a isoniacida

Juan Agapito<sup>1,2</sup>, José Espinoza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología Molecular (UBM), Laboratorios de Investigación y Desarrollo de Ciencia y Tecnología (LID), Universidad Peruana Cayetano Heredia

<sup>2</sup>Laboratorio de Micobacterias, Hospital Nacional Cayetano Heredia

## RESUMEN

**Antecedentes:** Emplear los métodos tradicionales para la determinación de la susceptibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a diferentes antibióticos demora en el mejor de los casos 8 semanas. Si usáramos técnicas de biología molecular la identificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes, mediante la detección rápida de los polimorfismos asociados en estos genes, sería en unas pocas horas.

**Métodos:** En 94 cultivos positivos de *M. tuberculosis* resistentes a isoniacida se hizo la extracción de ADN según lo descrito por Van Soolingen. Con el ADN se uso la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del gen *katG*. Para detectar la mutación Arg463Leu el fragmento amplificado fue digerido con *Nci*I. La mutación del codón 315 fue detectada por digestión del producto de PCR con *Msp*A11.

**Resultados:** Se encontró que sólo 9 (9.5%) de las 94 cepas resistentes tenían una mutación en el codón 463. En cambio con la endonucleasa de restricción *Msp*A11 hemos encontrado que las 94 (100%) cepas tenían una mutación en el codón 315, siendo la más prevalente AGC @ AAC (Ser315Thr).

**Conclusiones:** El 100% de las 94 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a isoniacida tuvieron una mutación en el codón 315 del gen *katG*.

## INTRODUCCIÓN

Hoy, después de 122 años de descubierto el agente causal y de más de medio siglo de contar con un tratamiento farmacológico efectivo, la tuberculosis continúa siendo un grave problema de salud. En 1997 hubo 16.2 millones de personas con enfermedad tuberculosa, de las cuales 7.96 millones fueron casos nuevos, 3.52 millones casos pulmonares con baciloscopia positiva (BK +), y 1.87 millones de personas murieron por la enfermedad. En nuestro continente para 1995 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reportó que la tuberculosis ocasionó la muerte de más de 75,000 personas y que 400,000 personas contrajeron la enfermedad. En el decenio 1990-1999 se reportó una incidencia

acumulada de 88 millones de nuevos casos de tuberculosis, de los cuales 8 millones fueron atribuidos a la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). (1,2)

Con la introducción de agentes antituberculosos efectivos durante la década de los 40s aparecieron al final de la misma los primeros reportes de resistencia a los medicamentos utilizados en pacientes con enfermedad por *Mycobacterium tuberculosis*. Se descubrió que este microorganismo presenta una resistencia natural a los fármacos antituberculosos que no se manifiesta si no se pone en contacto con éstos.

Fue así necesario utilizar la terapia combinada para el tratamiento exitoso de la tuberculosis. Los primeros esquemas fueron de una duración de 18 a 24 meses. Con la aparición de la rifampicina y el redescubrimiento de la pirazinamida se pudo tener el tratamiento acortado de 6 meses, cuando además se empleaban durante los 2 primeros meses conjuntamente a la isoniacida y a la estreptomina o el etambutol, y se empleaban intermitentemente por los 4 meses restantes a la rifampicina y a la isoniacida.

Pero la alegría de contar con un tratamiento altamente eficaz para tratar la tuberculosis puede ser opacada por la aparición de bacterias resistentes. La aparición de cepas resistentes a un fármaco no es un problema mayor, pues por ello usamos varios medicamentos simultáneamente. El problema se tendrá cuando nuestro paciente tiene tuberculosis multirresistente, y será una verdadera catástrofe cuando la cepa es resistente al menos a la rifampicina e isoniacida, que son los fármacos más poderosos en lo que se conoce como tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR).

El pronóstico de los pacientes que fracasan dependerá en gran medida de que hagamos un diagnóstico temprano del problema y que podamos diseñar un esquema que incluya idealmente por lo menos tres nuevos medicamentos a los que la cepa del paciente sea sensible. Y para ello el primer paso es identificar si el paciente tiene resistencia a los medicamentos antituberculosos. La dificultad está en que por los métodos tradicionales debemos esperar de 4 a 8 semanas para que crezca la cepa y

otro tanto para conocer su sensibilidad. Por ello se han desarrollado otros métodos que son un poco más rápidos: Los líquidos, por ejemplo usando el medio Middlebrook 7H11, los colorimétricos como el Alamar blue, los radioactivos, como el Bactec, pero en general necesitaremos de 2 a 4 semanas para tener un resultado. (3, 4)

Hoy sabemos que la resistencia del *M. tuberculosis* a los medicamentos es la amplificación de un fenómeno natural de mutaciones genéticas que conduce a la emergencia de resistencia clínica al tratamiento. Durante los últimos 20 años hemos determinado cuáles son los genes que codifican la resistencia para cada uno de los fármacos: *rpoB* para rifampicina, *KatG* e *inhA* para isoniacida, *embA,B,C* para etambutol, *PncA* para pirazinamida. (5, 6, 7, 8) Si usáramos técnicas de biología molecular la identificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes, mediante la detección rápida de los polimorfismos asociados en estos genes, sería en unas pocas horas. Indudablemente el utilizar esta metodología conllevará a repercusiones terapéuticas y epidemiológicas para el control de la enfermedad, pues un buen tratamiento podría instalarse rápidamente y de esta manera se conseguiría una pronta negativización del esputo, evitando la progresión de la enfermedad en el paciente y se reduciría la tasa de infección a los contactos intra y extra-domiciliarios.

Nosotros hemos desarrollado ya la metodología para determinar polimorfismos en el gen *rpoB*, y hemos determinado que el 96% de las cepas resistentes a rifampicina en el Perú los presentan. (9) igualmente, en la actualidad se han desarrollado técnicas de biología molecular para detectar resistencia a isoniacida que puede proporcionar información en 24 horas. La ventaja de estudiar la resistencia a isoniacida y a rifampicina es que son los dos fármacos indicadores de multidrogoresistencia. La resistencia a isoniacida en *M. tuberculosis* involucra a los genes *KatG* (catalasa-peroxidasa) e *inhA* (enoil-ACP-reductasa). (7)

Es por ello que diseñamos este trabajo cuyo objetivo fue conocer en cepas de *M. tuberculosis* con resistencia a isoniacida, determinada por los métodos tradicionales, aisladas de pacientes de la Sub-Región de Salud III-Lima Norte.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras clínicas utilizadas en el presente estudio fueron de pacientes diagnosticados con TB pulmonar provenientes del Hospital Cayetano Heredia y de los diferentes centros de Salud de la Sub-Región Lima Norte, Perú, durante el período 2003 al 2004. Se incluyeron 94 aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* para este estudio.

### Procedimientos

**Baciloscopia, cultivos y pruebas de susceptibilidad.**

Los procedimientos de baciloscopia y cultivo se realizaron siguiendo las especificaciones técnicas de Ziehl-Nielsen y Ogawa (10). La determinación de la susceptibilidad antituberculosa fue realizada con los 4 fármacos de primera línea siguiendo la variante económica del método de las proporciones de Canetti (11), para lo cual se usaron las siguientes concentraciones: isoniacida (H): 0.2 µg/ml, estreptomina (S): 4 µg/ml, rifampicina (R): 40 µg/ml, etambutol (E): 2 µg/ml. Como criterio de resistencia se utilizó el límite de susceptibilidad del 1% para todas las drogas.

### Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de cultivos micobacterianos.

La extracción de ADN se realizó de acuerdo a lo descrito por Van Soolingen (12). El ADN usado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue extraído de los cultivos positivos de *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida (H), obtenidos en el medio de Lowenstein Jensen.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del gen *KatG*

Para la amplificación del gen *KatG* se utilizaron los oligonucleótidos, cuya secuencia fue descrita por van Doonor. (13) Con ellos se logró por PCR un producto de amplificación de 642 pb del gen *katG*. La reacción del PCR (volumen final 20 µl) estuvo constituida por 5 ng de ADN genómico de *M. tuberculosis* y una mezcla de 2,0 µl de buffer 10x, 2,4 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1,6 µl de desoxinucleótidos fosfato 2.5 mM, 1 pmol de primer *katG1/KatG2* y 0.2 U de Amplitaq ADN polimerasa (Perkin Elmer). La reacción se llevó a cabo en un termociclador GenAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA), bajo las siguientes condiciones de temperatura: 95°C por 4 minutos, 8 ciclos de 95°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, posteriormente 32 ciclos de amplificación de 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, y 72°C por 1 minuto, y finalmente un ciclo de 72°C por 10 minutos.

Los productos de amplificación obtenidos mediante la reacción de PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer de corrida TBE (tris-acetato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M y EDTA 0.002 M). La electroforesis fue realizada en una cámara de electroforesis horizontal (Modelo H5, GIBCO BRL) a 60 V por 45 minutos en presencia de un marcador estándar de peso molecular (100 pb). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml.) durante 3 minutos y visualizados en un transluminador de luz UV (UVP, Modelo TM-20 San Gabriel USA).

### Análisis de PCR-RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)

Un par de primers, *KatG1* (5'-CTGCTCCGCTGGAGCAGATG-3') y *katG2* (5'-CCGACTTGGGCTGCAGGCG-3'), fueron usados para

amplificar un fragmento de 642pb (posición en el gen *KatG* 2847 a 3491 en la cepa H37Rv [Gen Bank número de acceso X68081]). Para detectar la mutación Arg463Leu del gen *KatG*, el fragmento amplificado fue digerido con endonucleasa de restricción: *NciI* (Amersham Pharmacia Biotech). *NciI* corta al tipo silvestre en dos posiciones, pero corta al tipo mutante Arg463Leu (CGG'ICTG) en una sola posición. (Figura Nº 1)

La mutación del codón 315 fue detectada por digestión del producto de PCR con *MspA11* (Amersham Pharmacia Biotech). *MspA11* corta al tipo silvestre en tres posiciones, pero corta al tipo mutante en dos posiciones: codon 315 (AGC'!AAC o ACA [Ser315Thr]), AGC'!AAC[Ser315Asn]), AGC'!ATC[Ser315Ile]). (Figura Nº 2)

Los fragmentos de restricción de DNA fueron analizados en agarosa al 2% y el fragmento obtenido fue visualizado bajo luz UV.

**RESULTADOS**

Este estudio lo efectuamos con 94 cepas de *M. tuberculosis*. Todas fueron al menos resistentes a la

Figura Nº 2. a. Secuencia del producto de amplificación de gen *KatG*, para *MspA11*

```

CTGCTCCGCTGGACAGATGGGCTTGGGCTGGAAGACCTCGTATGGCACCGGAAC
GGGTAAGGACCGGATCACCAAGCCGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACG
AAATGGACAAACAGTTTCCCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGGAAG
ACCCCTGCTGCGCTTGGCAATACACCGCCAAAGBACGGCCCGCTGGCCGACCAT
CCCGGACCGCTTGGCCGCGCCAGGGCTCCCGGAGGATGCTGGCCACTGACCTC
TCCTGCGGCTGGATCCGATATGAGCGGATCACGGCTCCGCTGCTGGAACACCC
CGAGGAATTGCGGACGAGTTCGDCAGGGCTGATCAAGCTGATCCAGCCACACA
TGGTCCCGTTCCGAGATGCTGGCCCGCTGGTCCCAAGCAGACCCCTGCTGTG
GCAGGATCCGCTCCCTGCGGTGAGCCAGCCTGCTGGCGAAGCCGAGATTGCCA
GCCTTAAGAGCCAGATCCGGGATCGGGATTGACTGTCTCACAGCTAGTCTGACGCG
CATGGCGCGCGGCTGCTGCTGCTGGTGGTAGCCACAAGCGCGCGGCGCCACCGG
TGTGTCATCGGCTGCGAGCCACAAGTCGGG
    
```

*MspA11*  
 Posiciones de corte del extremo 5' 5, 74 y 87pb  
 Secuencia de zona: GCAAGCAGCTGATCCAGCCACACA  
 Tamaño de los productos de restricción (M: 7, 68, 344 y 226 pb) (mut: 5, 412 y 226pb)

Figura Nº 2b: Productos de PCR-RFLP, digeridos con *MspA11*  
 M : Marcador 100pb; 1,2,3 : Aislamientos de diferentes cepas de *M. tuberculosis*, las flechas indican los fragmentos de ADN mutado

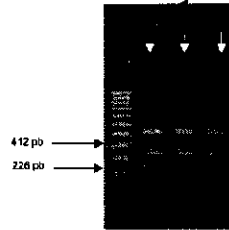


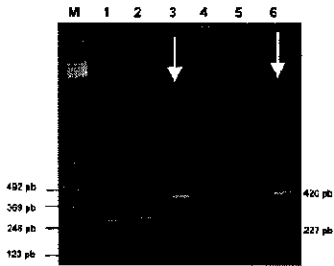
Figura Nº 1. a. Secuencia del producto de amplificación de gen *KatG*, para *NciI*

```

CTGCTCCGCTGGACAGATGGGCTTGGGCTGGAAGACCTCGTATGGCACCGGAAC
CGGTAAGGACCGGATCACCAAGCCGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACG
AAATGGACAAACAGTTTCCCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGGAAG
AGCCCTGCTGCGCTTGGCAATACACCGCCAAAGBACGGCCCGCTGGCCGACCAT
CGGTAAGGACCGCTTGGCCGCGCCAGGGCTCCCGGAGGATGCTGGCCACTGACCTC
TCCTGCGGCTGGATCCGATATGAGCGGATCACGGCTCCGCTGGCTGGAACACCC
CGAGGAATTGCGGACGAGTTCGDCAGGGCTGATCAAGCTGATCCAGCCACACA
TGGTCCCGTTCCGAGATGCTGGCCCGCTGGTCCCAAGCAGACCCCTGCTGTG
GAGGATCCGCTCCCTGCGGTGAGCCAGCCTGCTGGCGAAGCCGAGATTGCCA
GCCTTAAGAGCCAGATCCGGGATCGGGATTGACTGTCTCACAGCTAGTCTGACGCG
CATGGCGCGCGGCTGCTGCTGCTGGTGGTAGCCACAAGCGCGCGGCGCCACCGG
TGTGTCATCGGCTGCGAGCCACAAGTCGGG
    
```

*NciI*  
 Posiciones de corte del extremo 5' 225 y 517pb  
 Secuencia de corte: CCGCTGCGGCTG  
 Tamaño de los productos de restricción: (M: 227, 295 y 123pb) (mut: 227 y 420pb)

Figura Nº 1b: Productos de PCR-RFLP, digeridos con *NciI*  
 M : Marcador 123 pb  
 1,2,4,5 : ADN normal  
 3, 6 : ADN mutado



isoniacida. En 39 (41.4 %) la resistencia fue primaria y en 55 (58.5 %) adquirida. (Tabla Nº 1)

Tabla Nº 1. Resistencia primaria y adquirida en pacientes con tuberculosis pulmonar resistentes a Isoniacida

Tipo de paciente	Cepas	
	n	(%)
Sin tratamiento previo	39	41.4
Tratados previamente	55	58.5
<b>TOTAL</b>	<b>94</b>	<b>100.0</b>

En las cepas con resistencia primaria 2 sólo fueron resistentes a una droga, 10 a dos, 16 a tres y 11 a cuatro. Mientras que en las cepas con resistencia adquirida 3 lo fueron para una droga, 11 para dos, 23 para tres y 18 para cuatro (Tablas Nº 2 y 3).

Tabla Nº 2. Resistencia primaria por drogas en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar de la Sub-Región de salud Lima Norte.

Resistencia a drogas	Aislamiento	(%)
<b>A una droga</b>		
INH	2	5.1
<b>A dos drogas</b>		
INH + RIF	5	12.8
INH + SM	5	12.8
<b>A tres drogas</b>		
INH+SM + RIF	12	30.8
INH+ RIF + EMB	3	7.7
INH + SM + EMB	1	2.6
<b>A cuarto drogas</b>		
NH-SM-RIF+EMB	11	26.2
<b>RESISTENTES</b>	<b>39</b>	<b>100</b>

RFP=Rifampicina, INH=Isoniacida, SM=Estreptomicina y EMB=Etambutol

Tabla N° 3. Resistencia adquirida por drogas en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar de la Sub-Región de Salud Lima Norte.

Resistencia a drogas	Aislamiento	(%)
<b>A una droga</b>		
INH	3	5.5
<b>A dos drogas</b>		
INH + SM	7	12.7
INH + RIF	4	7.3
<b>A tres drogas</b>		
INH + SM + RIF	18	32.7
INH + RIF + EMB	5	9.1
<b>A cuatro drogas</b>		
RFP+INH+SM+EMB	18	32.7
<b>RESISTENTES</b>	<b>55</b>	<b>100.0</b>

RFP = Rifampicina, INH = Isoniacida, SM = Estreptomicina y EMB = Etambutol

La resistencia simultánea por lo menos a isoniacida y rifampicina (multidrogoresistencia) fue de 79.5% entre las cepas con resistencia primaria y 81.8 % entre las cepas con resistencia adquirida (Tabla N° 4).

Tabla N° 4. Multidrogoresistencia

Tipo de paciente	Cepas MDR		Todas	
	n	(%)	n	(%)
Sin tratamiento previo	31	79.5	39	100
Tratados previamente	45	81.8	55	100
<b>TOTAL</b>	<b>76</b>	<b>80.9</b>	<b>94</b>	<b>100</b>

El análisis microbiológico de susceptibilidad para los 94 aislamientos de *M. tuberculosis* se indica en la (Tabla N°5), en donde se observa el patrón de resistencia para cada uno de los antibióticos en estudio.

Los 94 aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar fueron analizados con endonucleasas de restricción para detectar mutación en el gen *KatG*.

Usando *Nci1* se encontró que sólo 9 (9.5%) de las 94 cepas resistentes tenían una mutación en el codón 463. En cambio con la endonucleasa de restricción *MspA11* hemos encontrado que las 94 (100%) cepas

Tabla N° 5: Patrón de resistencia en 94 cepas de *M. tuberculosis*

N° de ORDEN	COD PCR	N° DE CEPA	CENTRO DE SALUD	RESISTENCIA
1	I-001	669-02	Los Ibofodoros	R:INH/SM/RIF/EMB
2	I-002	6959	Pilar del Naranjal	R:INH/SWRIF S:EMB
3	I-003	6231	C.S. Primavera	R:INH/SWRIF S:EMB
4	I-004	6386	Rímac	R:INH/SM/RIF/EMB
5	I-005	7005	HNCH	R:INH/SWRIF S:EMB
6	I-006	7445	Villa Nota	R:INH/SWRIF S:EMB
7	I-007	2782	RNPAGL	R:INH/SM/RIF/EMB
8	I-008	2555	Amakela	R:INH/SWRIF S:EMB
9	I-009	2590	S.J. de Salinas	R:INH/RIF/EMB S:SM
10	I-010	7819	Confraternidad	R:INH/RIF/EMB S:SM
11	I-011	563-02	Mexico	R:INH/SM/RIF/EMB
12	I-012	3193	Cerro Candela Primavera	R:INH/SWRIF S:EMB
13	I-013	2907	HNCH	R:INH/SM/RIF/EMB
14	I-014	1071-02	HNCH	R:INH/SM/RIF/EMB
15	I-015	4732	Ciudad y Campo	R:INH/RIF S:SM/EMB
16	I-016	363-02	S.J.de Amancas	R:INH/RIF/EMB S:SM
17	I-017	4011	C.Custo Fernandini	R:INH/SWRIF S:EMB
18	I-018	7289	Caquetá	R:INH/SM/RIF/EMB
19	I-019	7789	Cerro Candela Primavera	R:INH/SM/RIF/EMB
20	I-020	6835	SMP	R:INH/SWRIF S:EMB
21	I-021	4183	Amakela	R:INH/RIF/EMB S:EMB
22	I-022	7081	Mariscal Castilla	R:INH/RIF/EMB S:SM
23	I-023	455-02	SMP	R:INH/RIF S:SM/EMB
24	I-024	575-02	Laura Caller	R:INH/SWRIF S:EMB
25	I-025	2861	Los Angeles	R:INH/SWRIF S:EMB
26	I-026	7352	Sagrado corazón de Jesús	R:INH/SM/RIF/EMB
27	I-027	668-02	C.S. Los Libertadores	R:INH/RIF/EMB S:SM
28	I-028	585	FCT	R:INH/SM/RIF S:EMB
29	I-029	5979	HNCH	R:INH/SM S:RIF/EMB
30	I-030	580	P.S.G.L.	R:INH/SM/RIF S:EMB
31	I-031	328	For de Amancas	R:INH/SM/RIF S:EMB
32	I-032	7006	Parú II Zona	R:INH/SM/RIF S:EMB
33	I-033	1294-02	Condesvita	R:INH/RIF S:SM/EMB
34	I-034	4694	HNCH	R:INH/SM S:RIF/EMB
35	I-035	845	HNCH Med. Tropical	R:INH/SM/RIF/EMB
36	I-036	808	Custo Fernandini	R:INH/SM/RIF/EMB
37	I-037	1103	S.J. de Salinas	R:INH/SM/RIF/EMB
38	I-038	6299	Caquetá	R:INH/SM/RIF/EMB
39	I-039	1147	Rímac	R:INH/SM/RIF S:EMB
40	I-040	1809	HNCH	R:INH/SM S:SW/RIF/EMB
41	I-041	1452	For de Amancas	R:INH/SM/RIF/EMB
42	I-042	1635	Los Olivos de Pro	R:INH/SM/RIF S:EMB
43	I-043	6120	parú II Zona	R:INH S:SM/RIF/EMB
44	I-044	4481	C.S. Primavera	R:INH/SWRIF S:EMB
45	I-045	140-02	HNCH	R:INH/SM/RIF/EMB
46	I-046	4077	Infantas	R:INH/RIF/EMB S:SM
47	I-047	1218	Rímac	R:INH/SM S:RIF/EMB
48	I-048	1266	PNP	R:INH/SWRIF/EMB
49	I-049	1567	Mexico	R:INH/SM/RIF/EMB
50	I-050	1324	Custo Fernandini	R:INH/SM/RIF/EMB
51	I-051	1407	Mexico	R:INH/SM S:RIF/EMB
52	I-052	1415	Rímac	R:INH/SM/RIF/EMB
53	I-053	1782	Rímac	R:INH/SWRIF S:EMB
54	I-054	1726	Rímac	R:INH/SM/RIF/EMB
55	I-055	7156	Infantas	R:INH/SM/RIF/EMB
56	I-056	2527	Mexico	R:INH/SM S:RIF/EMB
57	I-057	8	HNCH	R:INH/SM/RIF/EMB
58	I-058	87	S.M.P.	R:INH/SWRIF S:EMB
59	I-059	3061	Mariscal Castilla	R:INH/SM/RIF/EMB
60	I-060	215	C.S. César López Silva	R:INH/SWRIF S:EMB
61	I-061	216	Flor de Amancas	R:INH/SWRIF S:EMB
62	I-062	4968	C.S. Mexico	R:INH/SM S:RIF/EMB
63	I-063	287	Flor de Amancas	R:INH/SM/RIF/EMB
64	I-064	1081-02	Primavera	R:INH/RIF/EMB S:SM
65	I-065	7004	Confraternidad	R:INH/SM S:RIF/EMB
66	I-066	214	C.S. M. Infantil	R:INH/RIF/EMB S:SM
67	I-067	6843	C.S. Los Olivos	R:INH/SM/EMB S:RIF
68	I-068	986	S.M.P.	R:INH S:SM/RIF/EMB
69	I-069	727	Mesa Redonda	R:INH/RIF S:SM/EMB
70	I-070	749	H.N.C.H.	R:INH/SM/RIF/EMB
71	I-071	7770	HNCH	R:INH/RIF S:SM/EMB
72	I-072	950		R:INH/SWRIF S:EMB
73	I-073	102-02	Rímac	R:INH/RIF S:SM/EMB
74	I-074	7580	SMP	R:INH/SWRIF/EMB
75	I-075	3764	Perú IV Zona	R:INH/SWRIF S:EMB
76	I-076	4270	H.N.C.H.	R:INH/SM S:RIF/EMB
77	I-077	6373	HNCH	R:INH/SM/RIF/EMB
78	I-078	7177	Perú 4ta Zona	R:INH/SWRIF S:EMB
79	I-079	5601	H.N.C.H.	R:INH/SWRIF S:EMB
80	I-080	2176	H.N.C.H.	R:INH/SM S:RIF/EMB
81	I-081	3022	Rímac	R:INH/SWRIF S:EMB
82	I-082	5573	Carlos Custo Fernandini	R:INH/SM/RIF/EMB
83	I-083	2542	Los Olivos	R:INH/SWRIF S:EMB
84	I-084	4143	HNCH	R:INH/RIF S:SM/EMB
85	I-085	2440	Rímac	R:INH/SM S:RIF/EMB
86	I-086	4057	SMP	R:INH/SWRIF S:EMB
87	I-087	2863	Caquetá	R:INH/SM/RIF/EMB
88	I-088	2481	Los Olivos	R:INH/RIF S:SM/EMB
89	I-089	6297	Caquetá	R:INH/SM S:RIF/EMB
90	I-090	5127	Rímac	R:INH/RIF S:SM/EMB
91	I-091	3497	Lanico Prado	R:INH/SWRIF S:EMB
92	I-092	6352	Virgen del Pilar	R:INH/SM/RIF/EMB
93	I-093	3462	Valdiviezo	R:INH/SM/RIF S:EMB
94	I-094	4753	Los Angeles	R:INH/RIF S:SM/EMB

tenían una mutación en el codón 315. En todas estas cepas la mutación fue AGC<sup>1</sup>IAAC (Ser315Thr).

#### DISCUSION

El presente estudio es el primer trabajo que se hace en el Perú para conocer los polimorfismos presentes en el gen *KatG*, uno de los implicados en la resistencia a la isoniácida. Hay estudios previos con cepas de pacientes peruanos, pero que fueron realizados fuera de nuestro país, como el trabajo de Escalante, (14) que se hizo en Houston, Estados Unidos de Norteamérica.

El hallazgo más importante del presente estudio es que hemos encontrado que todas las cepas estudiadas presentan mutaciones en el codón 315 del gen *KatG*, lo cual concuerda con los estudios realizados por Escalante. La frecuencia de presentación de mutaciones en este codón varía desde un 30% en Singapur (15), hasta un 100% en Sudáfrica (16), pasando por un 52% en Madrid (17), 79% en el trabajo de Escalante en el Perú (14), y 93.6% en Rusia (18).

Si los resultados del presente estudio son una expresión real de lo que sucede en el Perú nos simplificaría enormemente los análisis genéticos necesarios en nuestro país para conocer si una cepa es o no resistente a la isoniácida, pues sólo tendríamos que buscar en el gen *KatG* los polimorfismos en el codón 315. A diferencia de lo que sucede con la rifampicina que, en los diferentes estudios efectuados en zonas diversas del mundo, (19,20,21,22) se conoce que polimorfismos en el gen *rpoB* determinan la resistencia del *M. tuberculosis* a este antibiótico en más del 90% de casos, para isoniácida estudiando las mutaciones en los codones 315 y 436 del gen *KatG* y en la región regulatoria del operón del gen *inhA* se logra determinar sólo entre el 70% y 98% de las mutaciones que han causado esta resistencia a isoniácida. (17, 23, 24,25)

En un estudio previo hemos encontrado que el 96% de las cepas estudiadas resistentes a rifampicina tenían mutaciones en el gen *rpoB*. (26) Y uno de los

hallazgos interesantes de ese estudio fue que 94.2% de las cepas resistentes a rifampicina lo eran además a isoniácida (9). Pero en el presente estudio hemos encontrado que lo contrario no es cierto, pues el 80.9% de nuestras cepas resistentes a isoniácida lo eran también a la rifampicina. (Tabla Nº 4)

Con los resultados obtenidos podemos ya conocer cuales son los polimorfismos en los genes que debemos estudiar en el cultivo de esputo de los pacientes con sospecha de ser portadores de tuberculosis MDR: Ser-531, His-526, Asp-516 en el gen *rpoB*, (5) y Ser 315 del gen *katG*.

La prueba de la catalasa fue la primera que se tuvo para identificar a una cepa resistente a un antibiótico que no fuera microbiológica. Los estudios de Zhang y Cohn encontraron que todas las cepas catalasa negativas eran resistentes a isoniácida. (27,28). Asimismo Wolinsky reportó que no expresaban catalasa el 82% de aislamientos resistentes a la concentración de >10 ig /mL de INH (29) Posteriormente, gracias a los trabajos de Stoeckle aprendimos que había cepas resistentes a isoniácida que eran catalasa positivas (30). Y así es que luego conocimos que además de *katG* habían otros genes que codificaban cepas resistentes a la isoniácida.

Cuando hayamos implementado este sistema de detección ultrarrápida de la MDR como servicio a los pacientes con contactos de MDR, como son los familiares próximos y los trabajadores de salud, y para los pacientes en quienes se sospeche que están fracasando, podremos tener en el país una certera ayuda diagnóstica que permitirá iniciar el nuevo esquema de tratamiento a estos enfermos antes de que tengan un deterioro clínico que dificulte su curación (31)

En conclusión, nuestros resultados demuestran que para buscar la presencia de mutaciones en los genes que codifican la sensibilidad a isoniácida sería suficiente estudiar las mutaciones en el codón 315 del gen *katG*, pues todas las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes las presentan.

## Bibliografía

1. Dolin, P.J., Raviglione, M.C., & Kochi, A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bulletin of the World Health Organization*. 1994; 72: 213-220.
2. Raviglione, M.; Snider, D. & Kochi, A. Global Epidemiology of Tuberculosis. *The Journal of the American Medical Association*. 1995. 273: 220-226.
3. Caminero JA., Casal M., Justina R., Pina J. M. and Sauret V. Diagnóstico de la tuberculosis. *Arch Bronconeumol*. 1996; 32:85-99
4. Casal M. sistema radiométrico semiautomático (BACTEC 460 TB) para microbiología clínica de tuberculosis y micobacteriosis. *Enf. Inf. Microbiol Clin* 1987; 5 :46-51
5. Heym, B, Alzari, PM, Honore, N, Cole ST. Missense mutations in the catalase-peroxidase, gene, *KatG* are associated with isoniazid resistance in *M. tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 1995: 15:235-240
6. Kiepiela P, Bishop K.S., Smith A. N., Roux L., and York D.F. Genomic mutations in the *KatG*, *InhA* and *aphC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from KwaZulu Natal, South Africa. *Tubercle Lung Disease* 2000. 80 (1), 47-56.
7. Kapur V, Li Ling-Ling, Iordanescu S., Hamrick M. R., Wanger A., Kreiswirth B. N., and Musser J. M. Characterization by Automated DNA Sequencing of Mutations in the Gene (*rpoB*) Encoding the RNA Polymerase B Subunit in Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from New York City and Texas. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994. Vol.32, No.4: 1095-1098.
8. Scorpio, A, Lindholm-Levy, P, Heifets, L, et al. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 540.
9. Agapito J., Baldeviano C. Accinelli R. and Espinoza J. Caracterización de las mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a la resistencia a rifampicina y tipificación molecular mediante RFLP (IS6110) en cepas de *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 2002. Vol3 Nº 19
10. CNLSP-INS-MINSA. Manual de Normas y Procedimiento en Bacteriología de la Tuberculosis (1995). Lima : INS; 1995. Serie de Normas Técnicas Nº 26.
11. Centro Panamericano de Zoonosis (CPZ-OPS/OMS). Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la Tuberculosis. Parte III: Sensibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas. La Identificación de Micobacterias (1986)
12. Van Soolingen D, Hermes PWM, De Hass PWE, van Embden JDA. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Research in Microbiology. Res. Microbiol* 1992; 143: 385-391.
13. Van Doonor H. R., Kuijper E. J., van Der Ende, Welter A. G. A, van Soolingen, De Hass PWE and Dankert J. The Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid and the Arg<sup>1</sup>Leu Mutation at Codon 463 of *Kat G* Are Not Associated. *J. Clin. Microbiol*. Apr 2001, p. 1591-1594.
14. Escalante P, Ramaswamy S., Sanabria H., Soini H., Pan X., Valiente-Castillo O. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tubercle and Lung Disease*. 1998. 79 (2): 111-118
15. Lee, A. S. G., Lim I.H.K.Tang I.L.H., Telenti A., and Wong S.Y. Contribution of *KasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1999. 43: 2087-2089
16. Ilaas, W.II., K. Schilke, J. Brand, B. Amthor, K. Weyer, P.B. Fourier, G. Bretzle, V. Sticht-Groth, and H.J. Bremer. Molecular analysis of *KatG* gene mutation in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1997 41:1601-1603
17. Pitaek A.S., Telenti A., Murray M.R., El-Hajj H. Jacobs W. R., Kramer F. R. And Alland D. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implication for rapid susceptibility testing. *Antimicrobi. Agents Chemother*. 2000. 44: 103-110.
18. Mokrousov, I., O. Narvskaya, T. Otten, E. Limeschenko, L. Steklova and B. Vyshnevskiy. High prevalence of *KatG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from north western Russia, 1996-2001. *Antimicro. Agents Chemother*. 2002. 46: 1417-1424.
19. Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston J. M. Matter L., Schopfer K., and Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet*. 1993. Vol.34 : March 13:647-650.
20. Valim A.R., Rossetti M.L., Ribeiro M., and Zaha A. Mutations in the *rpoB* Gene of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. Vol. 38 Nº 8: 3119-3122.
21. Musser, J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clinic. Microbiol*. 1995. Rev. 8: 496-514.
22. Van Rie A., Warren R., Mshanga I., Jordaan A. M., van Der Spuy G., Richardson M., Simpson

- J., Gie R., Enarson D., Beyeres N., van Helden P., and Victor T. C. Análisis for a Limited number of Gene Codon Can Predict Drug Resistanse of *Mycobacterium tuberculosis* in a High-Incidence Community. *Journal of Clinic Microbiology*. 2001. Vol. 39.N° 2 : 636-641.
23. Musser, J.M., V. Kapur, D:L: Williams, B.N. Kreiswirth, D, van Soolingen and J.D. van Embden. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid – resitant and susceptibility strain of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing : relicted array of mutation associated with drug resistance. *J. Infect. Dis* 1996. 24: 894-900.
  24. Morris S., Bai G. LL., Suffys P., Portillo-Gomez L., Fairchok M. and Rouse D. Molecular mechanisms of multidroug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infecti Dis*. 1995 .171:954-960
  25. Cockerill FR-3<sup>rd</sup>, Uhl JR, temesgen Z, Zhang Y, Stockmanl, Robert GD, Williams DI, Kline BC. Rapid identification of a point mutation of the *mycobacterium tuberculosis* catalse-peroxidase (*katG*) gene associated with isoniazid resistance. *J.Infect Dis* 1995 , 171:240-5
  26. Telenti A, Honore N, Bernasconi C., March J., Ortega A., Heym B., Takiff H.E., and Cole S.T. Genotypic Assessment of Isoniacida and Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculois*: a Blind Study at reference Laboratory Level. *Jurnal of clinical Mycrobiology*, Mar, 1997. p, 719-723
  27. Zhang Y, Heym B., Allen B., Young D. , Cole S. The Catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992: 358:591-3
  28. Cohn ML, Kovitz C., Oda U., Middelbrook G. Studies on isoniazid tuber bacilli. II. The grow requirements, catalasa activities and pathogenic properties of isoniazid-resistant mutants. *Am Rev Tuberc* 1954 : 70: 641-64
  29. Wolinsky E., Smith MM., Steenken W. Jr. Isoniazid susceptibility, catalase activitiy and guinea pig virulence of recently isolated cultures of tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc* 1956: 73:768-72
  30. Stoeckle MY., Guan L. , Rielger N., et al. Catalase-peroxidase gene sequences in isoniazid-sensitive and –resistants strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York City. *J Infec Dis* 1993; 168: 1063-5
  31. Chan Ed, et al. Treatment and outcome analysis of 205 patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:1103–1109.