

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS
ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA
(CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019**

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS
ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA
(CIM) EN EL PERIODO 2014 - 2019**

Realizado por:

DAYCI COLOMBIA BUELE CHICA

Director del Proyecto:

Dr. Lino Arisqueta Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

MASTER EN BIOMEDICINA

Quito, 28 de septiembre 2021

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS
ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA
(CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019**

DECLARACION JURAMENTADA

Yo Dayci Colombia Buele Chica, prometo cumplir con todos los ordenamientos, mandatos y disposiciones que señalan la Constitución y leyes de la República del Ecuador en el ejercicio de mi profesión y ser fiel a los postulados, principios y objetivos de la Universidad Internacional SEK.

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS
ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA
(CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS
ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA
(CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019**

Realizado por:

DAYCI COLOMBIA BUELE CHICA



Como Requisito para la Obtención del Título de:

MASTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

LINO ARISQUETA

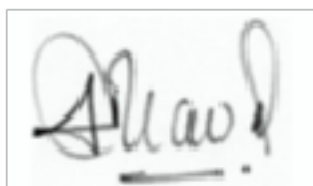
quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS
ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA
(CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019**

LOS PROFESORES INFORMANTES

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Navarro", enclosed in a thin black rectangular border.

Juan Carlos Navarro Castro

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "J. R. Ramírez", enclosed in a thin black rectangular border.

José Rubén Ramírez Iglesias

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS
ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA
(CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019**

DEDICATORIA

A todos quienes me apoyaron en este gran recorrido por el conocimiento y experiencias enriquecedoras.

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS
ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA
(CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019**

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a dios, y a todas las personas que me apoyaron para dar feliz termino a mi trabajo de tesis.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Caracterización de genes de resistencia en micobacterias atípicas aisladas en el Centro de Investigación Microbiológica (CIM) en el periodo 2014 - 2019.

Dayci Buele^{1,2} Lino Arisqueta¹

¹Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina,
dcbuele.mbme@uisek.edu.ec

²Centro de Investigación Microbiológica. URANTICORP S.A
dbuele@cim-ecuador.com

***Autor de correspondencia:**

Dayci Buele Chica, dcbuele.mbme@uisek.edu.ec/ dbuele@cim-ecuador.com

Titulo corto

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Running title: Caracterización de genes de resistencia de micobacterias atípicas.

Resumen:

El género *Mycobacterium* incluye más de 150 especies, de las que solo unas pocas (complejo *M. tuberculosis*, *M. leprae*) se consideran como patógenos primarios, siendo el resto de las especies consideradas como microorganismos ambientales que solo en determinadas circunstancias dan lugar a patología humana. En las últimas décadas la incidencia de las infecciones de piel y tejido blando, así como las enfermedades pulmonares producidas por el complejo *M. abscessus*, la MNT más relevante en patología humana, se ha incrementado significativamente en todo el mundo. En Ecuador, se han registrado infecciones de piel y tejidos blandos asociadas con procedimientos cosméticos causadas por este microorganismo.

El régimen de antibióticos recomendado para el tratamiento de la infección por *M. abscessus* (directrices ATS / IDSA 2007) es una terapia basada en varios macrólidos y, por tanto, la Claritromicina se considera un antibiótico clave. Sin embargo, *M. abscessus* ha demostrado ser resistente a múltiples antibióticos incluyendo la claritromicina.

La resistencia adquirida a Claritromicina se asocia con mutaciones puntuales en las posiciones 2058 y 2059 del gen *rrl* que codifica el rRNA 23S, siendo la primera la que causa una mayor elevación de MIC. La resistencia inducible es conferida por el gen *erm(41)*, que codifica las metilasas ribosomales de la eritromicina, y las mutaciones en el mismo provocan la pérdida de resistencia inducible.

En vista de la creciente incidencia de las infecciones por *M. abscessus* y los problemas con su tratamiento por culpa de la resistencia antibiótica, este trabajo se planteó el análisis de los mecanismos de resistencia a claritromicina de cepas previamente indentificadas como MNT y criopreservadas en el Centro de Investigación Microbiológica, Guayaquil. Para ello se empleó RT – PCR con sondas específicas para detectar variantes mutantes de los genes de resistencia mencionados más arriba. Además, se comparó un método de identificación por RT – PCR con el bien establecido método de diagnóstico por MALDI – TOF para micobacterias.

Nuestros resultados indican que la identificación basada en RT – PCR es una alternativa a las pruebas fenotípicas al uso para *M. abscessus*. También mostró que las RT - PCR para la detección de mecanismos de resistencia a claritromicina, aunque con limitaciones, son una buena alternativa a las pruebas de sensibilidad.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Palabras clave: Micobacterias no tuberculosas, resistencia a claritromicina, secuenciación, MALDI TOF.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Mycobacterium* incluye más de 150 especies, de las que solo unas pocas (complejo *M. tuberculosis*, *M. leprae*) se consideran como patógenos primarios, siendo el resto de especies consideradas como microorganismos ambientales que solo en determinadas circunstancias dan lugar a patología humana. Son ubicuas, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido consideradas saprófitas y microorganismos colonizadores (microorganismos que de forma estable se asientan en un nicho biológico, y establecen una relación simbiótica que puede ser comensalista, mutualista o parasítica) (Park et al., 2020)(Esteban & Esteban, 2019). Así, de entre todas las micobacterias, denominadas clásicamente como micobacterias atípicas o micobacterias no tuberculosas (MNT), sólo un grupo más reducido aparece como causante de infección en humanos con relativa frecuencia. La prevalencia y la incidencia de enfermedades humanas causadas por MNT están aumentando constantemente en todo el mundo (Park et al., 2020). La prevalencia de las enfermedades no transmisibles y las especies de micobacterias relacionadas difiere según el país y la zona (Park et al., 2020).

Desde el punto de vista microbiológico, los MNT son bacilos ácido- alcohol-resistentes (BAAR, denominación por la reacción a la tinción de Zielh-Neelsen), aerobios obligados, inmóviles, no esporulados, que no producen pigmentos y crecen en un rango de temperaturas entre 28 y 35°C. Dependiendo de la disminución o abundancia del glicopeptidolípido (GPL) o C-micósido en la pared celular, estas micobacterias pueden formar en los medios de cultivos dos tipos coloniales uno rugoso (R) y otro liso (S), respectivamente [(Ramírez & Araque Marquina, 2017b). Varias

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

características de las MNT, como una tasa de crecimiento lenta, una membrana externa rica en lípidos, células hidrófobas y formación de biopelículas que conducen a la persistencia de las MNT en entornos domésticos y asociados a humanos y, por lo tanto, aumentan la posibilidad de exposición a un huésped (Brennan & Nikaido, 1995).

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) no causan tuberculosis (TB); pero pueden causar enfermedades potencialmente mortales. El principal mecanismo de transmisión de las MNT es el aéreo y por la ingestión. No están descritos casos de transmisión entre humanos ni animal-humano de las MNT. Generalmente presentan un poder patogénico bajo, que varía de especie a especie, pudiendo ser oportunistas o simplemente saprófitas (Esteban & Esteban, 2019).

Aunque la infección por MNT exhibe características similares a la TB en términos de síntomas y tinción AFB, se requieren diferentes antibióticos para el tratamiento. Se ha encontrado que algunas especies de MNT son resistentes a muchos tipos de antibióticos, lo que convierte el tratamiento de la infección por MNT en un desafío debido al amplio espectro de resistencia de estos microorganismos (Ryu et al., 2016)(Cowman et al., 2016); (Ananta et al., 2018).

Entre las MNT más relevantes tenemos el complejo *M. abscessus*. Es la micobacteria de crecimiento rápido (MCR) más abundante en patología humana (Ramírez & Araque Marquina, 2017b). En las últimas décadas la incidencia de las infecciones de piel y tejido blando, así como las enfermedades pulmonares producidas por el complejo *M. abscessus* se ha incrementado significativamente en todo el mundo (Lee et al., 2015). En Ecuador, se han registrado infecciones de piel y tejidos blandos asociadas con procedimientos cosméticos causadas por estos microorganismos. En el Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIM) de Guayaquil, donde se

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

realiza diagnóstico microbiológico, se ha presentado una alta incidencia de este microorganismo, sobre todo en muestras de cirugía estética, infecciones pulmonares y tejido blando, lo que abunda en la importancia para la salud pública de este complejo de MNT. El tratamiento de las infecciones causadas por *M. abscessus* es difícil debido a que esta bacteria es intrínsecamente resistente a las drogas antituberculosas clásicas y también a la mayoría de antibióticos actualmente disponibles (Ramírez & Araque Marquina, 2017b).

Una característica especial de las MCR (especialmente de las cepas no pigmentadas) es su sensibilidad antimicrobiana, muy diferente a la de las cepas de crecimiento lento. En general, la gran mayoría de especies de MCR no pigmentadas son resistentes a los antituberculosos habituales (isoniazida, rifampicina, etambutol, pirazinamida y estreptomina), siendo sensibles a otros antibióticos empleados habitualmente en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas, tales como macrólidos, quinolonas, cotrimoxazol, tetraciclinas, aminoglucósidos, linezolid, algunos betalactámicos (cefoxitina, imipenem) o tigeciclina. Recientemente se ha publicado una estandarización de los estudios de sensibilidad para estos organismos, recogida en el protocolo de la SEIMC publicado en 2017, donde se establece la microdilución como la técnica de referencia para estos estudios de sensibilidad. Un dato de especial relevancia es que puede existir una importante variación de los patrones de sensibilidad, no solo entre las distintas especies, sino entre cepas de la misma especie, por lo que se recomienda la realización de estudios de sensibilidad individualizados en aquellos aislados que se consideren significativos (Ananta et al., 2018).

El régimen de antibióticos recomendado para el tratamiento de la infección por *M. abscessus* (directrices ATS / IDSA 2007) es una terapia basada en varios macrólidos y, por tanto, la

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Claritromicina se considera un antibiótico clave. Además, se ha informado de la susceptibilidad natural de *M. abscessus* a la Amikacina y, por tanto, se ha sugerido la inclusión de este antibiótico en el régimen de tratamiento (Ananta et al., 2018). Dos clases principales de resistencia a Claritromicina (macrólido) son la resistencia inducible y la adquirida (Ramírez & Araque Marquina, 2017a). La resistencia a Claritromicina adquirida se asocia con mutaciones puntuales en las posiciones 2058 y 2059 del gen *rrl* que codifica el rRNA 23S, siendo la primera la que causa una mayor elevación de MIC. La resistencia inducible es conferida por el gen *erm(41)*, que codifica las metilasas ribosomales de la eritromicina (Sharma et al., 2020). Varios estudios han investigado las funciones de *erm(41)* y *rrl* de *M. abscessus* para conferir resistencia a la Claritromicina (Ananta et al., 2018), pero con resultados inconsistentes. Estas mutaciones no explicaron todas las cepas de *M. abscessus* resistentes a Claritromicina y podrían existir otros mecanismos. La resistencia a la Amikacina también se explica parcialmente por mutaciones puntuales en las posiciones 1,406 a 1,409 en el gen *rrs* que codifica ARNr 16S. (Ananta et al., 2018). Las modificaciones de las regiones ARNr 23S y ARNr 16S han permitido explicar, en parte, la resistencia a macrólidos y aminoglicósidos. La metilación de los sitios blanco de acción de los macrólidos es otro factor importante, sobre todo en especies como *M. abscessus*. Éste último mecanismo explica la falla terapéutica que se ha reportado en pacientes tanto en infecciones pulmonares como en infecciones de la piel.

La espectrometría de masas MALDI - TOF (*Mass Spectrometry Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) se ha establecido ya como una técnica de referencia para la identificación bacteriana. A pesar de que el uso de esta técnica se ha extendido a un gran número de microorganismos, la aplicación de MALDI - TOF a la identificación de aislados de *Mycobacterium spp.* no ha sido

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

posible hasta el desarrollo de un método de procesamiento eficaz de los aislados que permitiera la ruptura de la pared celular y la extracción de las proteínas ribosomales. Estos dos objetivos se han conseguido mediante la aplicación de un paso de ruptura mecánica de las bacterias mediante agitación con bolas de cristal y/o sonicado y mejoras en el paso de extracción proteica (Alcaide et al., 2018). Los distintos procedimientos de preparación de muestras están estandarizados en la actualidad, lo que permite comparar los resultados de los diversos estudios llevados a cabo en distintas partes del mundo. Las dos principales plataformas de espectrometría de masas disponibles en los laboratorios de microbiología clínica (Bruker Daltonics –Alemania- y bioMérieux –Francia-) cuentan con bases de datos de referencia muy completas, con un número muy elevado de especies de micobacterias de interés clínico. Mediante el empleo de MALDI - TOF se pueden identificar microorganismos en aproximadamente 2 min, y los resultados obtenidos muestran una alta tasa de concordancia con la identificación del gen 16S rRNA.

La evaluación de ambas plataformas ha demostrado la elevada fiabilidad de las identificaciones de aislados del género *Mycobacterium* tanto a partir de medio sólido como de medio líquido (Esteban & Esteban, 2019). Cabe destacar que, a pesar de la gran complejidad taxonómica del género *Mycobacterium*, MALDI-TOF ha demostrado tener una elevada capacidad para discriminar especies estrechamente relacionadas. Esta técnica tiene capacidad de discriminación suficiente para llegar al nivel requerido, incluso en casos en los que se requiere secuenciar más de una diana genómica para lograr el mismo nivel de identificación (Rodríguez-Sánchez et al., 2015).

En este contexto de creciente incidencia de infecciones por *M. abscessus* y creciente resistencia a antibióticos de este microorganismo, se planteó el análisis de los mecanismos de resistencia de esta

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

micobacteria a claritromicina, un macrólido de amplia utilización en la clínica para MNT. Se planteó la comparación de métodos de identificación y análisis de sensibilidad a antibióticos fenotípicos (MALDI – TOF, microdilución en caldo Sensititre) con métodos de identificación y análisis de resistencia bacteriana basados en RT – PCR que emplean sondas específicas para *M. abscessus* y variantes silvestres y mutantes de los genes *erm(41)* y *rrl*.

HIPÓTESIS

Es posible identificar micobacterias atípicas del complejo *M. abscessus* y analizar sus mecanismos de resistencia a Claritromicina sin necesidad de secuenciación génica, ahorrando tiempo y dinero

OBJETIVOS

General

Caracterizar los mecanismos de resistencia a Claritromicina de *M. abscessus* aislados y conservados en el Centro de Investigación Microbiológica (CIM) de Guayaquil en el periodo 2014 – 2019 mediante combinación de pruebas fenotípicas y genotípicas

Específicos

Comparar un método de identificación basada en RT – PCR de 16S ADNr empleando sondas específicas para *M. abscessus* con el método MALDI – TOF implementado en el CIM

Analizar el mecanismo de resistencia inducible a claritromicina de *M. abscessus* mediante RT – PCR

Analizar el mecanismo de resistencia adquirida a claritromicina de *M. abscessus* mediante RT – PCR.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES Y EQUIPAMIENTOS

Los materiales, equipos y reactivos fueron proporcionados por el Centro de Investigación Microbiológica (CIM) de Guayaquil y la colaboración de la Universidad de las Américas (UDLA).

Tablas con reactivos, medios de cultivo, etc.

Tabla 1. Listado de reactivos empleados.

Reactivo	Formula	Casa comercial
Matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico)	$C_{10}H_7NO_3$	Bruker
Ácido fórmico	H-COOH (CH_2O_2).	Labsuply
Acetonitrilo	CH_3CN	Labsuplay
Alcohol	C_2H_5OH	Labsuplay
Virus DNA/RNA Purification kit		Roche
Ácido trifluoroacético	CF_3COOH	Sigma Aldrich

Equipos

Tabla 2 Listado de equipos empleados

Equipo	Modelo	Marca
Centrifuga	206/BL	FANEM
Centrifuga	Minicen	Orto Alresa
Incubadora	DIN 40050- IP 20	Memmert
Cabina de flujo laminar	TOPSAFE 1.2 60220	EuroClone S p.A
Frezzer -80°C	902 REL # 3	Thermo Electronic Corporation
Microscopio	U-SDO	Olympus Optical Co. LTD.
Espectrómetro de masas (MALDI – TOF)	Microflex	Bruker Daltonics

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Medios de cultivos

Tabla 3 Composición de los medios de cultivo empleados

Medio	Composición
Agar Lowestein Hensen	Fosfato monopotásico 2,5 g, Sulfato de magnesio 0,24 g, Citrato de magnesio 0,6 g, Asparagina 3,6 g, Harina de papa 30 g, Verde malaquita 0,4 g, Huevo batido 1 litro.
Agar Sangre de Cordero al 5%	Agar base sangre, 5% Sangre de cordero
Caldo CAMHBT	Caldo Mueller-Hinton con tampón TES con cationes ajustados

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Reactivación de los cultivos de micobacterias atípicas

Se analizaron 55 cepas de MNT procedentes del archivo del CIM, identificadas anteriormente mediante espectrometría de masas MALDI – TOF.

Las 55 muestras fueron tomadas de los ultracongeladores de -80°C donde se encontraban conservadas y se descongelaron rápidamente colocando los viales en agua a temperatura ambiente, para evitar el descongelamiento lento de las mismas y de esta forma evitar la disminución en la viabilidad de las cepas. Una vez descongeladas fueron sembradas en placas Petri con Agar Sangre de Cordero al 5% para obtener colonias puras y jóvenes y se incubaron de 3 a 5 días a 37°C. Las cepas que crecieron puras en las placas Petri fueron empleadas para la identificación mediante espectrometría de masas.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

2.2.2. Identificación fenotípica de micobacterias atípicas por espectrometría de masas MALDI - TOF

2.2.2.1. Extracción

Para la identificación por espectrometría de masas MALDI – TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of flight*) por sus siglas en Ingles, se emplearon dos métodos de preparación de las muestras a partir de las colonias de bacterias cultivadas por tres a cinco días tal y como se indica en el apartado 2.2.1.

Método 1: una de las colonias crecidas en Agar Sangre Cordero al 5% (Fig. 1) se colocó sobre la placa metálica del espectrómetro de masas (Fig. 2) empleando un palillo de madera estéril y se dejó secar al aire tras añadirle 1µl de ácido fórmico al 100%. Tras este paso, se añadió 1µl de solución saturada de la matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico y se dejó secar al aire. Esta solución se preparó disolviendo 2,5 mg de matriz en una mezcla de acetonitrilo, ácido fórmico, H₂O ultra pura en proporción 475:25:500 v/v/v. Tras este paso se procedió a la lectura.



Figura 1 Crecimiento de *Mycobacterium abscessus* en Agar Sangre de Cordero 5%

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019



Figura 2. Placa metálica sobre la que se coloca la muestra para la desorción/ionización mediante laser.

Método 2: se procedió según el Instructivo INST-TEC-N° 015 del Laboratorio del CIM. Partiendo de las mismas colonias que en el Método 1 se tomó suficiente biomasa para lograr, en un volumen final de 300 μ l de H₂O (grado HPLC), una concentración de 10⁵ ufc/mL(Escala McFarland) y las bacterias se inactivaron por 5 minutos a 90 °C. Después, se añadieron 900 μ l etanol 100% y se centrifugaron a máxima velocidad en centrifuga FANEM, modelo 206/BL (1174-1562g) 2 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500 μ l H₂O grado HPLC. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones por 2 min, se eliminó el sobrenadante y se volvió a resuspender en 50 μ l de H₂O. Se dejó enfriar la muestra y se añadieron 1200 μ l de alcohol 100% previamente enfriado a -20°C. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones por 2 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadió acetónitrilo 100 % (entre 10 y 50 μ l, dependiendo del tamaño del sedimento) y se mezcló muy bien mediante vortex. Tras esto, se añadió ácido fórmico 70%

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

(mismo volumen que acetonitrilo) y se mezcló con vortex. Se volvió a centrifugar durante dos minutos. Para la identificación se colocó 1 µl del sobrenadante en la placa metálica del MALDI – TOF y se dejó secar. Por último, se añadió 1 µl de la solución de matriz saturada y se dejó secar completamente.

2.2.2.2. Lectura e interpretación de resultados en MALDI - TOF

Una vez secas las colonias con la matriz, en la placa metálica del MALDI - TOF, se procedió a la identificación proteómica de las bacterias. Siguiendo el INST-TEC-N°030 del laboratorio CIM, se esperó a que se alcanzara el vacío en el equipo, y se procedió a la lectura de los pocillos de la placa metálica. Cada pocillo recibió 240 disparos de láser, los cuáles permitieron elevar las proteínas y acelerarlas en sistema TOF: según el tiempo de vuelo de cada proteína se determinó su masa molecular y el espectro obtenido se comparó con la base de datos (Software flexcontrol 3.1). Se consideraron como identificaciones óptimas todas aquellas con un score mayor de 1.999.

2.2.3. Prueba de susceptibilidad a antibióticos

Todas las cepas identificadas mediante MALDI – TOF fueron procesadas para analizar su susceptibilidad a antibióticos mediante microdilución en caldo según técnica Rapmyco, Sensititre®, Thermo Scientific (Alcaide y Col. 2017). Se empleó el caldo Sensititre® CAMHBT que es el indicado para micobacterias de crecimiento rápido.

2.2.3.1 Inoculación e incubación

El caldo CAMHBT se llevó a temperatura ambiente antes de ser usado. Se tomaron de 5 a 6 colonias de las cepas de *M. abscessus* crecidas en Agar Sangre Cordero al 5% con un hisopo y se emulsionaron en agua desmineralizada, se les dio vortex para obtener una suspensión homogénea

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

teniendo en cuenta la dureza de las colonias, y se ajustó la concentración a un estándar McFarland de 0,5 usando el nefelómetro Sensititre®. A continuación, 50 µl de la suspensión se transfirieron a un tubo de caldo CAMHBT 5 ml, para obtener un inóculo de 5×10^5 ufc / mL (intervalo de 1×10^5 a 1×10^6 ufc/mL) y se mezclaron bien. Después, se transfirieron 100 µL a cada pocillo de la placa Rapmyco Sensititre®. Para ello se vertió todo el contenido del tubo de caldo CAMHBT con el inóculo en una cubeta estéril y se procedió al pipeteo de los 100 µL en cada pocillo de la placa, el proceso culminó antes de los 30 minutos.

La placa fue cubierta con el sello adhesivo e incubada a 30 °C durante 3 a 7 días.

2.2.3.2 Lectura de los resultados de la prueba

Los resultados fueron leídos empleando el visor manual Sensititre® o el Vizion®. El crecimiento apareció como turbidez o como un depósito de células en el fondo de un pozo. La interpretación se llevó a cabo empleando la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M24-Ed3E, M62-Ed1E) del 2018.

2.2.4. Detección de Resistencia a Claritromicina mediante prueba PCR y confirmación de la identificación bacteriana

2.2.4.1. Extracción del ADN

Todas las cepas identificadas como *M. abscessus* fueron sub - cultivadas en placas de Agar Sangre Cordero al 5%. Mediante un hisopo de algodón, se procedió a recolectar tanta cantidad de colonias de *M. abscessus* cómo fue posible para obtener una biomasa que alcanzara una concentración $> 1 \times 10^8$ ufc/mL. Se colocó el hisopo de algodón en 500 µL de solución salina estéril, se dio calor

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

(65°C) con agitación por 5 minutos, se centrifugo a 1000 g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

2.2.4.2. Lisis bacteriana

Se tomó el pellet obtenido de cada cepa y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL, agregando 500 µL de Buffer GLX y 20 µL de Proteinasa K, se agito 1 minuto y se calentó en baño maría a 65°C por 15-30 minutos para mejorar la eficiencia de lisis.

2.2.4.3. Purificación de ADN

Se transfirieron 600 µL del lisado a una columna de spin RC2, (kit de extracción de Roche) y para la elución se procedió según las instrucciones del fabricante e instructivo técnico del CIM, INST-TEC-N°038. El producto purificado fue empleado para el ensayo de RT - PCR para la detección de resistencia a Claritromicina.

2.2.4.4. Ensayo PCR en tiempo real

Las sondas y primers empleados se listan en la **tabla 4** para la confirmación de la identificación de *M. abscessus* se empleó la sonda *Absc-chel 16S*; para la detección de la forma funcional completa de *erm(41)* se empleó la sonda *erm(41)_probe 1*; para la detección del polimorfismo de nucleótido único (SNPs) en la posición 28 de *erm(41)* se utilizaron las sondas *erm(41)T28* y *erm(41)C28*; y por último, para el SNP en la posición 2058 del gen *rrl* se emplearon las sondas *23S_A2058* y *23S_C2058*. Este método se realizó siguiendo lo descrito por (Sharma et al., 2020).

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Tabla 4. Tabla de referencia de primers y sondas empleadas en el estudio.

Objetivo		Secuencia
16 S	<i>Absc-chel 16S</i>	5'-6FAM-ACC ACA CAC TTC A-MGB-NFQ-3'
	<i>F Primer 16S</i>	5'-ATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTA-3'
	<i>R Primer 16S</i>	5'-CCACACCGCAAAAGCTTT-3'
Full length <i>erm(41)</i>	<i>erm(41)_probe 1</i>	5'-6FAM-TGC TAG CCG TCG AGC TGC ATC C-QSY-3'
	<i>F Primer TR</i>	5'-TCAGGGGAGTTCGTTGTGGAT-3'
	<i>R Primer TR</i>	5'-TCTTCCTCGGCAAACCGT-3'
<i>erm(41)</i>	<i>erm(41)T28</i>	5'-HEX-CCA + G + T + G GGG C-IABKFQ-3'
	<i>erm(41)C28</i>	5'-6FAM-CCA + G + C + G GGG C-IABKFQ-3'
	<i>F PrimerE28</i>	5'-GAGCATGGGCATATTCATGATGG-3'
	<i>R PrimerE28</i>	5'-TGAGCGAACACCGGATTTCG-3'
<i>rrl</i>	<i>23S_A2058</i>	5'-6FAM-CGGCAGGACGAAAAGACCC-BHQ1-3'
	<i>23S_C2058</i>	5'-6FAM-CGGCAGGACGACAAGACCC-BHQ1-3'
	<i>F PrimerR2058</i>	5'-GCCAAATTGCACTACGAGTAAAG-3'
	<i>R PrimerR2058</i>	5'-CCTATCCTACACAAACCGAACC-3'

MGB minor groove binder, HEX hexachlorofluorescein, 6FAM 6-carboxyfluorescein, IABKFQ lowa black fluorescent quencher, BHQ1 Black hole quencher, NFQ Non-fluorescent quencher, +, LNA bases.

Fuente: Sharma et.al., 2020.

Las sondas y primers de Integrated DNA technologies (IDT) liofilizados se disolvieron a una concentración de 100 µM con agua destilada ultrapura. A partir de aquí se prepararon 4 diluciones de trabajo (WS) para cada pareja de primers y su sonda o sondas respectivas (Tabla 4) a una concentración de 2,5 µM para las sondas y 10 µM para los primers.

Las reacciones se realizaron en volumen final de 25uL con 12.5 uL de master mix (ECUGEN 001, UDLA, Quito, Ecuador) y una concentración de las sondas de 250 nM y de primers de 1uM respectivamente.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Cada muestra fue corrida por duplicado. Fueron empleados controles positivos y negativos durante el proceso (Control positivo cepas 4 y 20 de *M. abscessus* de resistencia conocida a la Claritromicina, control negativo agua ultrapura). El proceso de Real time PCR fue realizado usando Tianlong Gentier 48 system, las condiciones del termociclador incluyeron una desnaturalización a 95° C x 3min, 40 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 30s y 72°C por 30s.

3. RESULTADOS

3.1. Identificación de micobacterias atípicas

El objetivo del presente estudio fue identificar y analizar los mecanismos de resistencia a macrólidos, específicamente a Claritromicina, en micobacterias atípicas de la especie *Mycobacterium abscessus*. Para ello, se partió de 55 cepas previamente identificadas como micobacterias atípicas, aisladas y criopreservadas en el cepario del Laboratorio Clínico del CIM (Guayaquil, Ecuador). El primer paso, tras la reactivación, consistió en la identificación de las bacterias. Para ello, se empleó el análisis proteómico mediante MALDI – TOF, tal y como se explica en materiales y métodos. Esta técnica presenta varias ventajas en relación a las técnicas moleculares basadas en el análisis de secuencias de ADN, como son la rapidez y el bajo coste.

De las 55 cepas analizadas, 30 cepas fueron positivamente identificadas como *M. abscessus*, con *scores* por encima de 1.9 que, según la plataforma del equipo MALDI - TOF permiten una identificación confiable a nivel de género y especie. La **tabla 5** muestra las identificaciones de las cepas y los *scores* obtenidos y la **figura 3** un proteinograma representativo correspondiente a *M.*

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

abscessus. Las 25 micobacterias restantes correspondieron a: *M. fortuitum* (12), *M. marinum* (2), *M. chelonae* (3), *M. asiaticum* (4) y *M. senegalense* (4).

Tabla 5. Identificación proteómica mediante MALDI - TOF de micobacterias atípicas criopreservadas en el CIM

Especie bacteriana	Nº de cepas identificadas	Score
<i>Mycobacterium abscessus</i>	30	1,999 a 2,304
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	12	1,999 a 2,315
<i>Mycobacterium marinum</i>	2	1,978 a 2,123
<i>Mycobacterium chelonae</i>	3	1,999 a 2,032
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	4	1,987 a 2,234
<i>Mycobacterium senegalense</i>	4	1,934 a 2,124

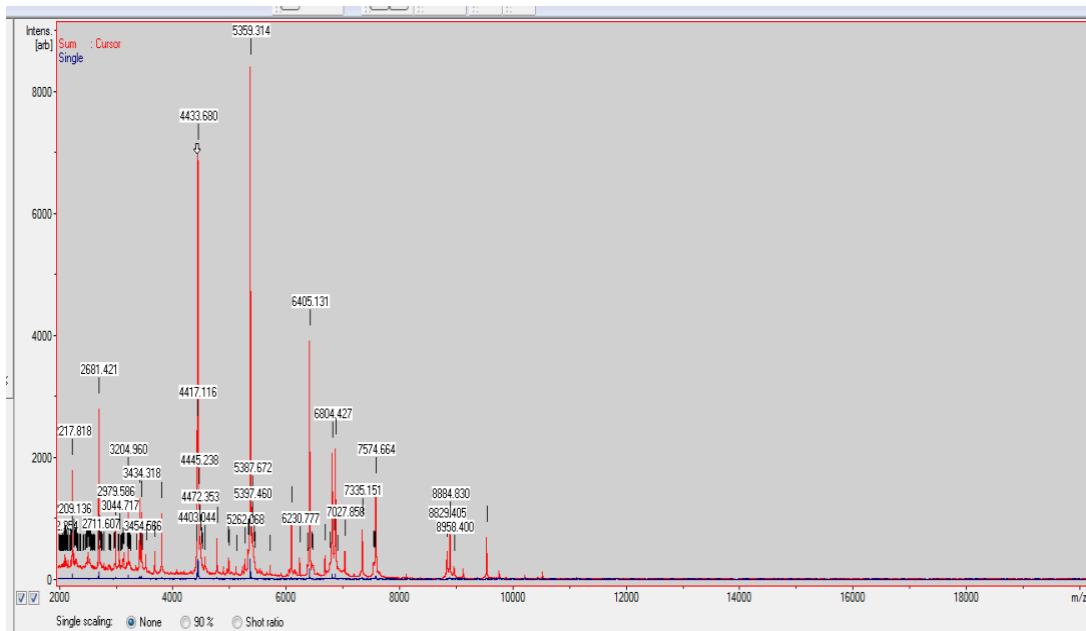


Figura 3. Proteinograma representativo correspondiente a *M. abscessus*, obtenido en la corrida de las cepas en el MALDI-TOF.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Además de la identificación fenotípica basada en el proteoma bacteriano, se realizó una confirmación de la identificación mediante RT – PCR del gen 16S ARNr, empleando sondas internas específicas para *M. abscessus*, tal y como describen Sharma y colaboradores (Sharma et al., 2020). La concordancia entre la identificación fenotípica basada en el proteoma y la identificación genotípica basada en 16 S fue del 100% tal y como se muestra en la **tabla 6**. Para los otros grupos de micobacterias atípicas identificadas por MALDI – TOF, la identificación por método RT-PCR resulto negativa en las 5 cepas analizadas.

Tabla 6. Concordancia entre la identificación fenotípica basada en el proteoma y la identificación genotípica basada en 16 S.

Especie identificada por MALDI - TOF	Cepas analizadas	Identificación como <i>M. abscessus</i> por RT – PCR 16 S ADNr
<i>M. abscessus</i>	30	100 % Positivo
MNT distintas de <i>M. abscessus</i>	5	100% Negativo

3.2. Sensibilidad a antibióticos de *M. abscessus*

Una vez confirmada la identificación de nuestras bacterias como *M. abscessus*, se procedió al análisis de susceptibilidad a antibióticos mediante el sistema Sensititre de microdilución en caldo. La **tabla 7** muestra los resultados de susceptibilidad a varios antimicrobianos de las 30 cepas de *M. abscessus* analizadas. Los resultados obtenidos muestran que el 100% de las *M. abscessus* son sensibles a la Amikacina y se evidencia una alta resistencia a la Doxiciclina y al Imipenem, (el 93,33% de las cepas). En cuanto a la Claritromicina nuestras *M. abscessus* presentaron un 33,3%

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

de resistencia. Para el resto de antibióticos analizados, las cepas presentan un 50 – 60% de resistencia. Esto corresponde a bacterias multidrogorresistentes (MDR).

Tabla 7. Resultados de sensibilidad de las cepas de *M. abscessus* mediante Sensititre (7 días)

Nº CEPA	AK	CIP	CLA	DOX	IMI	LNZ	MOX	STX	TG	TOB
1	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
2	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
4	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
5	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
6	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
7	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R
8	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
9	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R
10	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
11	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S
12	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S
13	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
14	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
15	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R
16	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R
17	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
18	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R
19	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R
20	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R
21	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R
22	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
23	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R
24	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
25	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
26	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
27	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
28	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
29	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S
30	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R

AK: Amikacina, CIP: Ciprofloxacina, CLA: Claritromicina (negrita), DOX: Doxiciclina, IMI: Imipenem, LNZ: Linezolida, MOX: Moxifloxacina, STX: Trimetropin/Sulfametoxazol, TG: Tigeciclina, TOB: Tobramicina

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Como el objetivo del presente trabajo fue analizar los mecanismos de resistencia a Claritromicina, se muestra otra tabla (**Tabla 8**) donde se indican los resultados únicamente para este antibiótico: las cepas con valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) superiores a los puntos de corte establecidos por la CLSI a los tres días (≥ 8) se consideraron como constitutivamente resistentes y aquellas con valores por debajo de los mismos como sensibles (≤ 2).

Tal y como puede observarse, 10 de las 30 cepas, presentaron resistencia a Claritromicina, de las cuales, las cepas 27, 28 y 30 tal vez podrían considerarse como de resistencia inducible puesto que se produce un marcado aumento de MIC desde 2 (día 3) hasta 8 (día 7). Sin embargo, la CLSI establece que para considerar una MNT como de resistencia inducible, debe ser sensible en los primeros 7 días y alcanzar un valor de MIC ≥ 16 . Sin embargo, no tenemos el dato a 14 días.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Tabla 8. Resultados de sensibilidad de las cepas de *M. abscessus* mediante Sensititre (7 días)

CEPA	Concentración mínima inhibitoria (CIM)	
	DÍA 3	DÍA 7
1	0,12	0,25
2	0,12	0,25
3	0,25	0,5
4	8	16
5	0,06	0,12
6	8	16
7	16	16
8	16	16
9	0,06	0,12
10	0,06	0,12
11	0,06	0,12
12	0,12	0,25
13	0,06	0,12
14	0,06	0,12
15	0,12	0,25
16	0,12	0,5
17	0,06	0,12
18	0,06	0,12
19	0,06	0,06
20	0,25	0,5
21	0,06	0,06
22	0,06	0,12
23	0,06	0,12
24	8	16
25	16	16
26	8	16
27	2	8
28	2	8
29	0,12	0,25
30	2	8

*Valores de referencia de MIC para Claritromicina en *M. abscessus* puntos de corte según CLSI: Sensible ≤ 2 , Intermedio 4, Resistente ≥ 8 . Las cepas resistentes se indican en negrita.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

3.3. Análisis de genes de resistencia a Claritromicina en *M. abscessus*

Tras el análisis fenotípico de sensibilidad a antibióticos, quisimos analizar los mecanismos subyacentes a la resistencia a Claritromicina observada (**Tabla 8**). Para ello, analizamos la presencia o ausencia de dos genes relacionados con dos tipos de resistencia empleando una RT – PCR con sondas internas específicas de cada una de las variantes genéticas (Sharma et al., 2020).

El gen *erm(41)* (*erythromycin ribosomal methyl transferase 41*) es responsable de la resistencia inducible (IR) a Claritromicina, por lo que la presencia de este gen completo, funcional, debería observarse en micobacterias con este tipo de resistencia. Además, se analizó la presencia de una forma truncada de este gen y de una mutación puntual (SNP, *single nucleotide polymorphism*), T28C, ambas asociadas a la pérdida de IR. La resistencia constitutiva, en cambio, es responsabilidad de un SNP (A2058C) en el gen *rrl* (23S peptidil transferasa de la subunidad grande de 23S).

En la **tabla 9** se muestran los resultados de RT – PCR junto al perfil de resistencia a Claritromicina, para la comparación de los resultados genotípicos y fenotípicos.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Tabla 9. Resistencia a Claritromicina detectada mediante microdilución (método sensititre) y método PCR.

Nº Cepa	Sensibilidad a claritromicina	<i>erm(41)</i> longitud completa	Variante <i>erm(41)</i> T28C	<i>erm(41)</i> truncada	Variante <i>rrl</i> A2058C
1	S	+	T	-	A
2	S	+	T	-	C
3	S	+	T	-	A
4	R	+	T	-	C
5	S	+	T	-	C
6	R	+	T	-	C
7	R	+	T	-	A
8	R	+	T	-	C
9	S	+	T	-	C
10	S	+	T	-	A
11	S	+	T	-	A
12	S	+	T	-	A
13	S	+	T	-	A
14	S	+	T	-	A
15	S	+	T	-	A
16	S	+	T	-	A
17	S	+	T	-	A
18	S	+	C	-	A
19	S	+	T	-	A
20	S	+	T	-	A
21	S	+	T	-	A
22	S	+	C	-	A
23	S	+	T	-	A
24	R	+	T	-	C
25	R	+	T	-	C
26	R	+	T	-	C
27	IR*	+	T	-	C
28	IR*	+	T	-	C
29	S	+	T	-	A
30	IR*	+	T	-	C

S: sensible; R: Resistente; IR: resistencia inducible. El asterisco indica que ese dato debe tomarse con cautela debido a que no se tienen datos de MIC a 14 días. Columna 4: T, variante funcional; C, variante no funcional. Columna 6: A, variante funcional; C variante no funcional.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Tal y como se muestra en la **tabla 9**, todas las cepas presentaron la versión de longitud completa, del gen *erm(41)*, lo que haría a estas bacterias, en principio, poseedoras de resistencia inducible a Claritromicina. Sin embargo, solo las cepas 27, 28, y 30 parecen presentar este tipo de resistencia. Las cepas constitutivamente resistentes (4, 6, 7, 8, 24, 25 y 26) podrían presentar este mecanismo de IR, pero apantallado por la presencia de resistencia constitutiva.

Por otro lado, dos de las cepas, presentaron el SNP T28C (cepas 22 y 18) del gen *erm(41)* y consecuentemente, sensibilidad a Claritromicina. Por último, ninguna de las cepas presentó la versión truncada de *erm(41)*.

En relación al gen *rrl*, 12 de las 30 cepas (40%) presentaron la mutación asociada a resistencia constitutiva, A2058C, de las cuales la mitad presentaron este tipo de resistencia. Entre las 6 restantes, están también las cepas 27, 28 y 30 que como mencionamos anteriormente podrían presentar resistencia inducible.

Existen inconsistencias, en nuestros datos, entre los resultados de sensibilidad mediante Sensititre y los resultados de análisis de los genes de resistencia por RT – PCR. En primer lugar, esperaríamos mucha mayor frecuencia de la resistencia inducible, puesto que todas las cepas poseen la versión de longitud completa de *erm(41)* y, sin embargo, solo las mencionadas 3 parecen presentar esta resistencia (27, 28 y 30). Por otro lado, las cepas 2 y 5 que poseen la mutación en *rrl* A2058C, no presentan resistencia constitutiva, sino que son sensibles. Además, la cepa 7 presenta resistencia constitutiva pero no posee la mutación A2058C.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

4. DISCUSIÓN

Mycobacterium abscessus se ha convertido en una de las principales causas de enfermedades respiratorias y de infecciones de los tejidos blandos y tiene una resistencia natural a muchos antibióticos *in vitro*, lo que complica el tratamiento clínico y conduce a resultados insatisfactorios. Los macrólidos, como la Claritromicina y la Azitromicina, son considerados como la base del régimen terapéutico para las infecciones complejas por *M. abscessus*. Sin embargo, la resistencia a la Claritromicina está aumentando dramáticamente en esta MNT.

El espectro de infecciones causadas por MCR(micobacterias de crecimiento rápido) es enormemente amplio e incluye numerosos síndromes clínicos (Elliott et al., 2017). Sin embargo, entre ellos hay tres grupos especialmente relevantes: las infecciones respiratorias, las infecciones de piel y partes blandas, y las infecciones asociadas a biomateriales. Cada una de ellas plantea problemas terapéuticos específicos (Esteban & Navas, 2018). En el caso de las infecciones de piel y partes blandas (Esteban et al., 2010), muchas de ellas se asocian con procedimientos cosméticos tales como mesoterapia, depilación o tatuajes, dando lugar a cuadros crónicos que, si bien no suelen suponer un riesgo vital para el paciente, sí producen complicaciones estéticas de importancia incluso tras la curación de los cuadros clínicos. En nuestro caso, el 100 % de las cepas de *Mycobacterium abscessus* estudiadas proceden de aislados de infecciones en piel y partes blandas, 28 de ellas aislados en la ciudad de Guayaquil y 2 en la Ciudad de Machala.

Las infecciones producidas por MNT han sido bastante ignoradas y hasta hace algunos años no se les daba mucho seguimiento. Sin embargo, las infecciones recurrentes en pacientes con cirugías reconstructivas y cirugías plásticas, han llamado la atención del sector investigativo y médico, lo que ha permitido que los ministerios y los sectores de vigilancia epidemiológica presten más atención a este tipo de infecciones. En los últimos años, el desarrollo de la tecnología

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

molecular y los avances implementados en estas técnicas han permitido que se logre una mejora en la identificación de diferentes especies de MNT que han venido generando complicaciones en la salud, y a su vez ha permitido la descripción de nuevas especies. Sin embargo, estas técnicas no están disponibles en todos los laboratorios debido a su alto costo, la complejidad de su empleo y la necesidad de contar con personal capacitado en su implementación y desarrollo. El MALDI-TOF puede proporcionar a los laboratorios una técnica avanzada, rápida y segura para la identificación de micobacterias, sin dejar de lado la efectividad de la identificación por métodos moleculares, pero que al ser más costosos requieren otro tipo de implementación en los laboratorios.

La resistencia a Claritromicina detectada en la última década en las MNT ha sido un problema en la salud que mantiene en alerta a la comunidad médica. La demora en la detección de esta resistencia por métodos convencionales como la microdilución (sensititre) y la no efectividad observada en los tratamientos, ha hecho necesaria la búsqueda de técnicas que permitan la detección de esta resistencia en un menor tiempo y con una mayor eficiencia y efectividad. En ese sentido, se han desarrollado pruebas de detección de mecanismos específicos basados en RT – PCR empleando sondas específicas para cada variante génica. Los estudios realizados por Sharma y colaboradores en el año 2020 demostraron la efectividad de estos métodos para la detección rápida de algunos mecanismos de resistencia a Claritromicina.

En nuestro trabajo se empleó RT - PCR para analizar los mecanismos de resistencia a Claritromicina en 30 aislados de *M. abscessus* siguiendo la metodología propuesta por Sharma y colaboradores en 2020. Además, se empleó una sonda para detectar el gen 16S de *M. abscessus* y confirmar la identificación realizada mediante MALDI – TOF, obteniendo un 100% de

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

concordancia. Esto es importante, porque los métodos estándar de identificación bacteriana suelen implicar una larga batería de pruebas bioquímicas mediante métodos automatizados como las tarjetas Vitek^R que tienen un elevado costo por identificación. Además, actualmente, estos sistemas automatizados no cuentan con pruebas específicas para micobacterias, incluyendo *M. tuberculosis* y *M. leprae*. En ausencia de un equipo de MALDI – TOF, cuyo poder diagnóstico para este grupo de bacterias ya ha sido demostrado (Mediavilla-Gradolph et al., 2015), solo quedaría la secuenciación de genes conservados (16S, hsp65, etc.) como única alternativa. En ese sentido, el desarrollo de pruebas rápidas de RT – PCR, constituye una aproximación prometedora. Es fácil de realizar, y solo requiere de un aparato de RT – PCR que incluso los laboratorios de investigación suelen tener.

Además de la comparación entre métodos de identificación, nuestros objetivos específicos incluían el análisis de dos mecanismos de resistencia a Claritromicina, inducible y constitutivo. Para ello, se empleó de nuevo la RT – PCR en este caso con sondas específicas para variantes silvestres y mutantes de *erm(41)*, responsable de la IR, y *rrl*, responsable de la resistencia constitutiva.

En relación al primer mecanismo, se procedió a detectar la presencia de *erm(41)* de longitud completa, funcional, y una versión truncada no funcional del mismo que provoca pérdida de IR. Además, también se detectó el principal SNP responsable de la pérdida de IR (T28C). Nos llamó particularmente la atención, que todas las cepas analizadas mostraron la versión completa de *erm(41)*. Sin embargo, solo en tres de las cepas observamos IR. Esto debe ser tomado con precaución debido a que no tenemos la determinación de MIC a 14 días para la mayoría de las

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

cepas y la CLSI indica que para considerar una bacteria como IR para Claritromicina debe incubarse por más de 14 días. Además, estas cepas mostraron también la mutación responsable de resistencia constitutiva, lo que hace aún más confuso el resultado de sensibilidad antibiótica. Sin embargo, el aumento de MIC desde el día 3 al día 7 que observamos en las cepas 27, 28 y 30 es muy notable, y teniendo el gen funcional de *erm(41)*, decidimos catalogarlos como IR. Tampoco cabe descartar que algunas de las cepas que mostraron sensibilidad constitutiva pudiera tener IR también y que ésta fuera enmascarada en los ensayos de sensibilidad. Por otro lado, la no detección de la versión truncada de *erm(41)* en ningún aislado de *M. abscessus* concuerda con la bibliografía que nos indica que esta mutación es más propia de *M. massiliense*. Por último, las cepas 18 y 22 mostraron el SNP T28C y la consecuente pérdida de IR.

En cuanto a la resistencia constitutiva, dependiente de mutaciones en *rrl*, 12 de las 30 cepas mostraron el SNP A2058C, pero solo 7 de estas mostraron una clara resistencia constitutiva, ya que otras 3 cepas con este SNP (27, 28 y 30) fueron catalogadas como IR. Además, una de esas 7 cepas (cepa 7), no contenía la mutación y probablemente presentaba otro mecanismo de resistencia a Claritromicina. Esto nos deja con 3 cepas (2, 5 y 9) que no deberían ser sensibles por presentar el SNP A2058C.

Nuestros resultados, por tanto, muestran algunas inconsistencias entre las pruebas fenotípicas de sensibilidad, y las pruebas genotípicas de resistencia a Claritromicina. En primer lugar, el mecanismo de IR, debería estar presente en muchas más cepas ya que la presencia de *erm(41)* funcional fue ubicua mientras que las mutaciones que provocarían pérdida de IR solo se encuentran en 2 cepas (18 y 22). Para la explicación de estos resultados, se requeriría secuenciación de *erm(41)*

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

para detectar otras posibles mutaciones. En segundo lugar, existen tres bacterias que presentan el SNP A2058C en *rrl* y que por tanto deberían ser resistentes, pero no lo son. Esto puede deberse a errores en la prueba de sensibilidad o en la interpretación de los resultados de la misma. Cabe destacar, que de las 10 cepas que presentan resistencia a claritromicina, 9 presentaron el SNP A2058C.

En definitiva, estas pruebas de RT – PCR, aunque presentan algunas limitaciones y falta de concordancia con las pruebas fenotípicas, son un método rápido y fácil para analizar mecanismos de resistencia a Claritromicina que puede ser implementado en la clínica para la toma de decisiones terapéuticas.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

CONCLUSIONES

No es necesaria la secuenciación de genes conservados, ni una amplia batería de pruebas bioquímicas para la identificación de *M. abscessus*. Tanto el MALDI – TOF como la RT – PCR con sonda específica para 16S fueron una alternativa rápida y económica.

Las pruebas para la detección de resistencia constitutiva a Claritromicina son una alternativa mucho más rápida que las pruebas fenotípicas de sensibilidad y deberían implementarse con el objetivo de ganar tiempo en el diagnóstico y acelerar el tratamiento adecuado.

Las pruebas para la detección de resistencia inducible no son muy confiables ya que no concuerdan demasiado con técnicas fenotípicas de sensibilidad que están bien asentadas en la práctica clínica. Para *erm(41)* no debería descartarse la implementación de otras pruebas basadas en RT – PCR o incluso la secuenciación.

RECOMENDACIONES

Debería implementarse el MALDI – TOF como método de diagnóstico para MNTs, ya que es más rápido y barato que sus alternativas basadas en baterías bioquímicas, secuenciación e incluso RT – PCR.

Se recomienda realizar la secuenciación *erm(41)* en las 30 cepas de *M. abscessus* empleadas en este estudio para confirmar la resistencia inducible a Claritromicina y analizar sus mecanismos asociados.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

BIBLIOGRAFIA

- Alcaide, F., Amlerová, J., Bou, G., Ceysens, P. J., Coll, P., Corcoran, D., Fangous, M. S., González-Álvarez, I., Gorton, R., Greub, G., Hery-Arnaud, G., Hrábak, J., Ingebretsen, A., Lucey, B., Mareković, I., Mediavilla-Gradolph, C., Monté, M. R., O'Connor, J., O'Mahony, J., Rodriguez-Sanchez, B. (2018). How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(6), 599–603. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.012>
- Ananta, P., Kham-ngam, I., Chetchotisakd, P., Chaimanee, P., Reechaipichitkul, W., Namwat, W., Lulitanond, V., & Faksri, K. (2018). Analysis of drug-susceptibility patterns and gene sequences associated with clarithromycin and amikacin resistance in serial Mycobacterium abscessus isolates from clinical specimens from Northeast Thailand. *PLoS ONE*, 13(11), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208053>
- Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 29–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333>
- Cowman, S., Burns, K., Benson, S., Wilson, R., & Loebinger, M. R. (2016). The antimicrobial susceptibility of non-tuberculous mycobacteria. *Journal of Infection*, 72(3), 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.12.007>
- Elliott, B., Barbara, A., Brown-elliott, B. A., & Philley, J. V. (2017). *Rapid #*: -11490020. 1–19. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0027-2016>.Correspondence
- Esteban, J., & Esteban, J. (2019). *MESA : Micobacterias no tuberculosas*. 18(3), 131–134.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

Esteban, J., & Navas, E. (2018). Tratamiento de las infecciones producidas por micobacterias no tuberculosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 36(9), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.10.008>

Esteban, J., Ortiz-Perez, A., Alcaide, F., & Esteban, J. (2010). Infecciones cutáneas y de partes blandas por micobacterias no tuberculosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(SUPPL. 1), 2787–2799. <https://doi.org/10.1517/14656560903369363>

Lee, M.-R., Sheng, W.-H., Hung, C.-C., Yu, C.-J., Lee, L.-N., & Hsueh, P.-R. (2015). Mycobacterium abscessus Complex Infections in Humans . *Emerging Infectious Diseases*, 21(9). <https://doi.org/10.3201/2109.141634>

Lin, C., Russell, C., Soll, B., Chow, D., Bamrah, S., Brostrom, R., Kim, W., Scott, J., & Bankowski, M. J. (2018). Increasing prevalence of nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens from US-affiliated pacific Island Jurisdictions. *Emerging Infectious Diseases*, 24(3), 485–491. <https://doi.org/10.3201/eid2403.171301>

Mediavilla-Gradolph, M. C., De Toro-Peinado, I., Bermúdez-Ruiz, M. P., García-Martínez, M. D. L. Á., Ortega-Torres, M., Montiel Quezel-Guerraz, N., & Palop-Borrás, B. (2015). Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterium Species Isolated from Clinical Specimens. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/854078>

Park, H. E., Kim, S., Shim, S., Park, H. T., Park, W. Bin, Im, Y. Bin, & Yoo, H. S. (2020). 16S and 23S Rrna Gene Mutation Independent Multidrug Resistance of Non-Tuberculous Mycobacteria Isolated From South Korean Soil. *Microorganisms*, 8(8), 1–19.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA (CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081114>

Ramírez, A., & Araque Marquina, M. (2017a). Aspectos clínicos y microbiológicos de las infecciones producidas por el complejo *Mycobacterium abscessus*. *Avances En Biomedicina*, 6(2), 120–132.

Ramírez, A., & Araque Marquina, M. (2017b). Patógenos emergentes multirresistentes: complejo *Mycobacterium abscessus*. *Avances En Biomedicina*, 6(3), 203–215.

Rodríguez-Sánchez, B., Ruiz-Serrano, M. J., Marín, M., Roa, P. L., Rodríguez-Créixems, M., & Bouza, E. (2015). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nontuberculous mycobacteria from clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2737–2740. <https://doi.org/10.1128/JCM.01380-15>

Ryu, Y. J., Koh, W. J., & Daley, C. L. (2016). Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease: Clinicians' perspectives. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 79(2), 74–84. <https://doi.org/10.4046/trd.2016.79.2.74>

Sharma, M. K., La, Y., Janella, D., & Soualhine, H. (2020). A real-time PCR assay for rapid identification of inducible and acquired clarithromycin resistance in *Mycobacterium abscessus*. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05686-0>

Sweetline Anne, N., Ronald, B. S. M., Senthil Kumar, T. M. A., & Thangavelu, A. (2019). Conventional and molecular determination of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* isolates in cattle. *Tuberculosis*, 114(June 2018), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.12.005>.

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN MICOBACTERIAS
ATÍPICAS AISLADAS EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA
(CIM) EN EL PERIODO 2014 – 2019**