

# VIII

## Jornadas de Tuberculosis en Sevilla.



20 DE MARZO DE 2025

REAL E ILUSTRE COLEGIO DE MÉDICOS DE SEVILLA

### **Experiencia en la aplicación de la secuenciación de genoma completo (WGS) en la detección de resistencias en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* en Sevilla, España.**

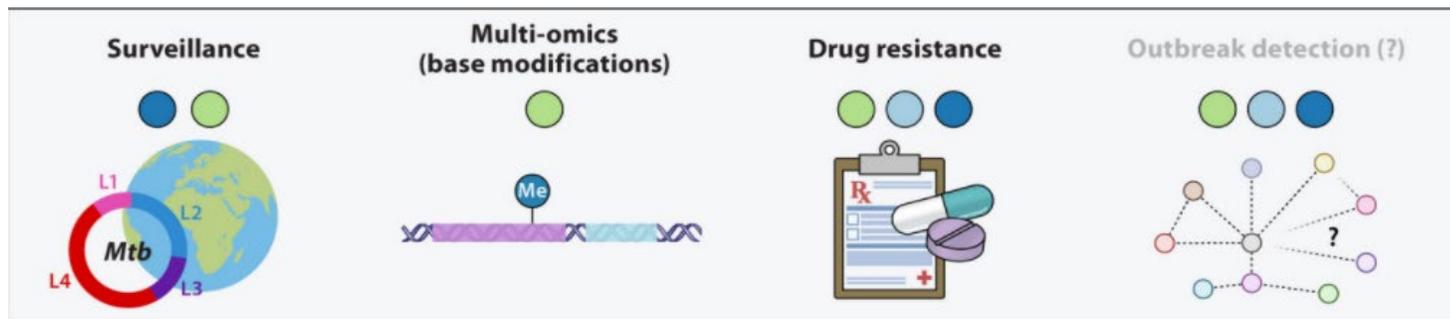
María Aznar 1, Mariana López 2, María José Torres 3, Lorena Clavijo 1, Rafael Luque 1, Eduardo Briones 4, Juan Francisco Medina 1, Carmen Calero 1, Raquel Valencia 1, José Antonio Lepe 1, Iñaki Comas 2, Verónica González Galán 1

1Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, 2Unidad de Genómica de la Tuberculosis. Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV,CSIC), Valencia, 3Universidad de Sevilla, Sevilla, 4Distrito sanitario Sevilla.CIBERESP: Centro de Investigación en Red Epidemiología y Salud Pública, Sevilla, Sevilla.

## Introducción: aplicaciones de la secuenciación masiva

La secuenciación masiva es el método de referencia a nivel mundial para el estudio epidemiológico de las cepas de *M. tuberculosis*

- **Las principales aplicaciones** de WGS en TB se centran en el control de la enfermedad al mejorar:
  - la rápida detección de grupos de transmisión
  - la vigilancia epidemiológica de distintas cepas a través de las fronteras un país.
    - el diagnóstico de cepas de MTBC e identificación de linaje.
    - **la predicción de sensibilidad a fármacos**



## Introducción: Resistotipo



***M. tuberculosis* es una especie clonal en la que no se produce recombinación ni transferencia horizontal de genes, el mecanismo de adquisición de resistencias suelen ser las mutaciones puntuales.**

Fármaco	Gen implicado
Rifampicin	Subunidad B RNA ( <i>rpo</i> )
Isoniazida	Enoil-acp-reductasa ( <i>inhA</i> ) Catalasa-peroxidasa ( <i>katG</i> ) Alquil-hidroxiperoxideoxireductasa ( <i>ahpC</i> )
Etambutol	Arabinosil-transferasa ( <i>embC,A,B</i> )
Estreptomycin	Proteína ribosomal subunidad 12 ( <i>rpsL</i> ) RNA ribosomal 16 S ( <i>rrs</i> )
Pirazinamida	Pirazinamidasa-nicotinamidasa ( <i>pncA</i> )
Quinolonas	Subunidad A de la DNA girasa ( <i>gyr A</i> )

### Predicción de sensibilidad a fármacos.

Se basa en la presencia o ausencia de mutaciones específicas relacionadas resistencias a lo largo del genoma de *M.tuberculosis*, por lo que es necesario tener catálogos de mutaciones de alta calidad que ayuden a predecir resistencias con alta confianza.

**La secuenciación genómica completa, tiene el potencial de proporcionar un perfil completo de cambios nucleótidos asociados a resistencias.**

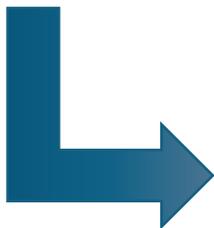
**Detección precoz de las mutaciones** en los genes que codifican la resistencia a los fármacos de primera y segunda línea en los aislamientos de *M. tuberculosis* complex (Resistotipo) permitiría **la instauración precoz del tratamiento adecuado** y dirigido en las infecciones por cepas multirresistentes

## Introducción

10 millones  
casos tbc en 2022



1,3 millón R INH  
0,5 millón R a RIF (rpoB)  
Otros anti-tbc: ausencia de  
conocimiento



World Health  
Organization

- ✓ Desarrollo de un catálogo de mutaciones y su asociación con la resistencia fenotípica a los anti-tbc.
- ✓ Proporciona un estándar de referencia para la interpretación de mutaciones que confieren resistencia a todos los medicamentos de primera línea y una variedad de los de segunda línea.
- ✓ Guía en el desarrollo de nuevas pruebas moleculares de sensibilidad a fármacos, incluida la secuenciación de última generación.

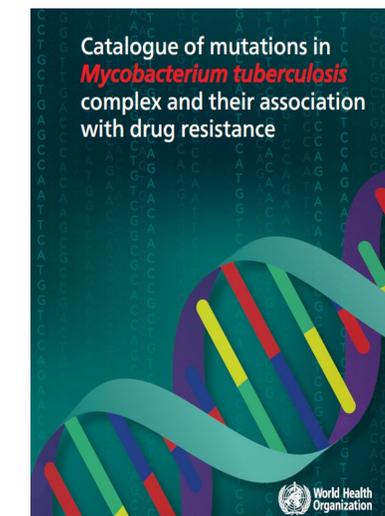
### Geographical distribution of data

Forty-one countries contributed data on five or more MTBC isolates, 32 countries on  $\geq 50$  and 17 on  $\geq 500$ . Only one (United Kingdom) contributed  $\geq 5000$  isolates (Fig. 1).

Fig. 1. Global distribution of sources of data on MTBC isolates used in this catalogue of genotype-phenotype associations



The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

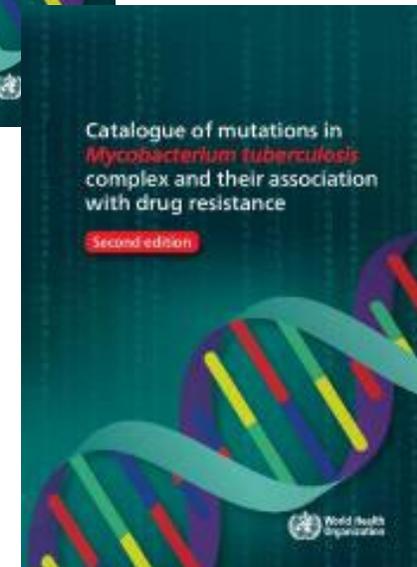
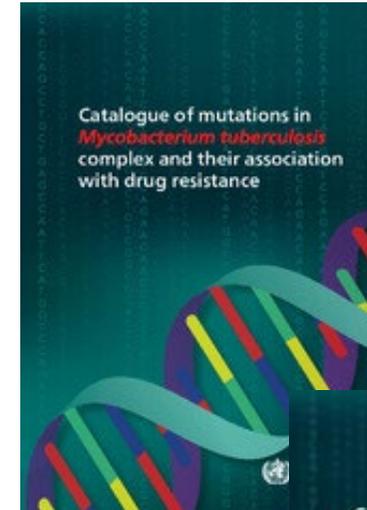


## Objetivos:

En el año 2021, la OMS publicó el **Catálogo de mutaciones de *M. tuberculosis* y su asociación con la resistencia a antibióticos**, obtenidas por **secuenciación masiva a nivel mundial**.

Los **objetivos** de este trabajo son:

- 1.- **Conocer si existen cepas resistentes en nuestra área que **no** hayamos detectado con el **antibiograma fenotípico o las técnicas moleculares** implementadas de rutina.**
- 2.- **Saber si, en el caso de existir cepas resistentes, estas se encuentran en transmisión.**





2020

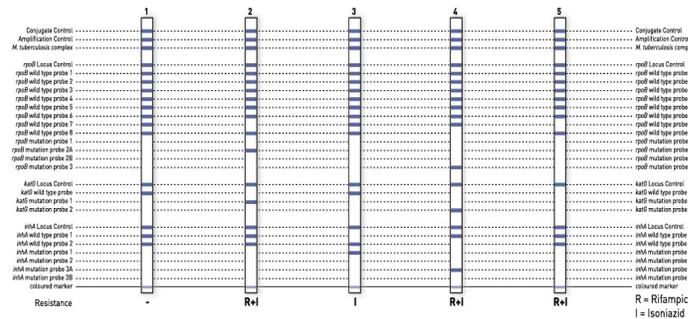


2022

**130** cepas de **MTBC** muestras clínicas  
HUVR



Antibiograma método  
semiautomatizado  
BACTEC mgit SIREP.  
Becton Dickinson™



Estudio molecular con los sistemas  
genotype MDR-PLUS Bruker™ y/o Genxpert  
ULTRA Cepheid™.



Secuenciación  
masiva (tecnología  
Illumina™)

- Extracción
- Normalización ADN
- Librería
- Secuenciación
- Análisis

# Resultados



TOTAL	Resistentes	AMI/CAP/KANA	EMB	INH	EHT	PZA	RIF	STM
<b>130</b>	12	3	2	7	3	2	2	2

	Sample	AMI	CAP	EMB	ETH	INH	KAN	PZA	RIF	STM	Summary DR
cluster 3	101149256	R	R	S	S	S	R	S	S	U	Aminoglycosides-R (resist cruzada)
cluster 15	101436938	S	S	S	R	R	S	S	S	R	INH+ETH-R (resist cruzada)
cluster 15	101472613	S	S	S	R	R	S	S	S	R	INH+ETH-R (resist cruzada)
	101492679	S	S	R	U	S	S	S	S	S	EMB-R
cluster 10	101617927	S	S	S	U	U	S	S	R	S	RR
cluster 3	101694877	R	R	S	S	S	R	S	S	U	Aminoglycosides-R (resist cruzada)
	102045470	S	S	U	R	R	S	S	S	U	INH+ETH-R (resist cruzada)
cluster 13	102134581	S	S	U	U	R	S	S	S	S	INH-R
cluster 13	102246930	S	S	U	U	R	S	S	S	S	INH-R
	102292208	R	R	R	S (R-indel)	R	R	R	R	U	MDR+PZA+EMB+ETH+aminoglycosides
	102608048	U	U	S	U	S	U	R	S	U	PZA-R
	201980945	S	S	S	U	R	S	S	S	S	INH-R

## Resultados



Resistencia (N)	Mutación
RIF (1)	rpoB,Rv0667,761155,TCG,TTG,S450L
MDR+PZA+EMB+ETH+aminoglycosides(1)	rpoB,Rv0667,761155,TCG,TTG,S450L; pncA,Rv2043c,2289054,GAC,GCC,D63A; embB,Rv3795,4247431,ATG,ATA,M306I; ETH, 4326231,CA,C,ethA_1243_del_1_ca_c; IG_Rv1315_Rv1316c, pos: 1473246, A/G, rrs_a1401g
INH(3)	katG, S315T
INH-R + ETH-R(3)	IG_Rv1482c_Rv1483, pos: 1673425, C/T, inhA_c-777t/fabG1_c-15t
AMI-R+CAP-R+ KAN+R(2)	IG_Rv1315_Rv1316c, pos: 1473246, A/G, rrs_a1401g
EMB-R (1)	embA_IG,IG_Rv3793_Rv3794, pos: 4243221,C/T, embA_c-12t
PZA-R (1)	pncA, H57D

## Conclusiones



- **Todas las cepas resistentes a rifampicina e isoniacida** del análisis por secuenciación presentaron las **mismas resistencias en el antibiograma fenotípico.**

- ✓ A pesar de que el 90% de las cepas del área son pansensibles, en nuestra área **hay cepas resistentes circulando y formando parte de clúster de transmisión.**
- ✓ **Debemos de seguir realizando estudios de sensibilidad mediante técnicas moleculares y fenotípicas** para abordar el tratamiento de estos enfermos.
- ✓ Destaca la presencia de **cepas monoresistentes a etambutol y pirazinamida** escasamente descritas en nuestro país.
- ✓ Al **no encontrar resistencia a quinolonas** en nuestra área, se podrían emplear los regímenes que las incluyen para el tratamiento propuestos por la OMS.