



ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA PCR MULTIPLEX PARA LA DIFERENCIACIÓN DE *M. tuberculosis* y *M. bovis* EN MUESTRAS DE ESPUTO.

Susana Flores-Villalva^a, E. Rodríguez^a, Anaya EA^a, C. Perea^b, F. Milián^b, G. Canto^b.

^aCENID Fisiología, INIFAP. Ajuchitlán, Colón, Qro., flores.susana@inifap.gob.mx, rodriguez.elba@inifap.gob.mx, anaya.ana@inifap.gob.mx

^bFacultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro., claudia.a.perea@gmail.com, feliciano.milian@uaq.mx, gcanto07@uaq.mx

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa de curso crónico que afecta principalmente al sistema respiratorio aunque puede diseminarse a otros órganos. Esta enfermedad es causada por bacterias del complejo *M. tuberculosis*, del cual forman parte *M. tuberculosis* y *M. bovis*, se caracterizan por tener el 99.9% de identidad a nivel de nucleótidos y una secuencia idéntica de RNAr 16S. *M. tuberculosis* es el principal agente causante de tuberculosis en humanos; sin embargo, *M. bovis*, el agente causal de tuberculosis bovina es responsable del 10 al 15% de casos de tuberculosis en humanos. La identificación de la especie de micobacteria causante de tuberculosis es de vital importancia en la salud pública, epidemiología y tratamiento de la enfermedad ya que *M. bovis* es resistente a uno de los antibióticos de primera línea, la pirazinamida. El diagnóstico de la infección se realiza a través de la baciloscopia seguido del cultivo bacteriano; pero, este último puede tomar hasta 4 semanas. Es por eso que en los últimos años se han desarrollado métodos moleculares basados en la identificación de secuencias específicas de *M. tuberculosis* con el objetivo de aumentar la precisión y obtener resultados en un tiempo mucho menor. No obstante estos métodos no permiten la identificación a nivel de especie de las bacterias del complejo *M. tuberculosis*. Por lo que el objetivo de este estudio fue desarrollar un método de PCR que permita la identificación y diferenciación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en muestras de esputo. Este método consiste en la amplificación del gen *rpoB* para la identificación de *Mycobacterium* spp. Así como la amplificación de un fragmento de 150 pb de la región de diferenciación 8 (RD8) presente en *M. tuberculosis*, y un fragmento de 360 pb de la región RD8 ausente en *M. bovis*.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa transmitida por aerosoles y que se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas. Esta enfermedad es causada por bacterias del complejo *M. tuberculosis*, del cual forman parte *M. tuberculosis* y *M. bovis*, se caracterizan por tener el 99.9% de identidad a nivel de nucleótidos y una secuencia idéntica de RNAr 16S. *M. tuberculosis* es el principal agente causante de tuberculosis en humanos; sin embargo, *M. bovis*, el agente causal de tuberculosis bovina es responsable del 3 al 10% de casos de tuberculosis en humanos. La infección en los humanos puede ocurrir por inhalación de aerosoles o a través del consumo de leche no pasteurizada. Considerándose un riesgo ocupacional en veterinarios, granjeros y trabajadores de rastros. La transmisión entre personas es posible dependiendo del estatus inmunológico del individuo. El diagnóstico de la infección se realiza a través de la baciloscopia seguido del cultivo bacteriano; pero, este último puede tomar hasta 4 semanas. Es por eso que en los últimos años se han desarrollado métodos moleculares basados en la identificación de secuencias específicas de *M. tuberculosis* con el objetivo de aumentar la precisión y obtener resultados en un tiempo mucho menor. No obstante estos métodos no permiten la identificación a



nivel de especie de las bacterias del complejo *M. tuberculosis*. La identificación de la especie de micobacteria causante de tuberculosis es de vital importancia en la salud pública, epidemiología y tratamiento de la enfermedad ya que *M. bovis* es resistente a uno de los antibióticos de primera línea, la pirazinamida. Por lo que el objetivo de este estudio fue desarrollar un método de PCR que permita la identificación y diferenciación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en una reacción de PCR y que pueda ser usado subsecuentemente en muestras de esputo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo bacteriano

Las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AN5 fueron donadas por el Dr. Pabello, responsable del laboratorio de Tuberculosis en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los viales conteniendo las cepas anteriormente mencionadas, fueron cultivados en condiciones de bioseguridad en el laboratorio de ciencias de la Facultad de Veterinaria, en la Universidad Autónoma de Querétaro. Las cepas se descongelaron y se incubaron por 30 minutos a 37°C en baño maría. Posteriormente se colocaron 500 µl de la suspensión de bacterias en un tubo con 4500 µl de PBS 1 X estéril, se mezclaron perfectamente bien. Para dispersar los agregados bacterianos, la suspensión se pasó dos veces a través de una jeringa con aguja 27G X 13 mm. En seguida, se realizaron diluciones decuples seriadas y se sembraron 100 µl de cada una en placas con agar Middlebrook 7H1 con enriquecimiento OADC (Becton Dickinson BBL). Las placas inoculadas se incubaron por un período de 4-6 semanas hasta hacerse visible el crecimiento. De estas bacterias se tomó una muestra para realizar el aislamiento del ADN micobacteriano.

Aislamiento de ADN micobacteriano.

Mediante un método descrito para micobacterias se extrajo el ADN de las cepas de referencia. Las colonias se homogenizaron con 400 µl de TE (100mM tris-HCl, 10mM EDTA pH 8) y se inactivaron a 80°C en baño maría por 10 minutos; posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adicionó 50 µl de lisozima (10mg/ml) (SIGMA-Aldrich, USA) y se incubó por 16 horas a 37°C. Posteriormente se agregaron 75 µl de SDS al 10% y 50 µl de proteínaasa K (1mg/ml) (SIGMA-Aldrich, USA) y se incubó 20 minutos a 65°C. Se agregaron 100 µl de NaCl 5M y posteriormente 100 µl de una solución de NaCl 5M con 5% de N-cetyl-N,N,N-trimetyl bromuro de amonio (CTAB) (SIGMA-Aldrich, USA) y se incubó 10 minutos a 65°C. El ADN se extrajo con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (SIGMA-Aldrich, USA). El ADN se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol absoluto (SIGMA-Aldrich, USA) y se lavó con 1 ml de etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas (GIBCO, Auckland, N.Z) La concentración y pureza del ADN se evaluó por espectrometría (D.O. a 260/280 nm) utilizando un espectrofotómetro tipo Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, USA).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos empleados en este estudio se diseñaron empleando el programa IDT SciTools Primer QuestSM, los cuales se describen en la tabla 1. Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima de alta fidelidad Taq polimerasa (Master Mix, Invitrogen) usando reacciones de 20µl. La concentración de cada uno de los oligonucleótidos usados por reacción fue de 0.1µM utilizando el siguiente protocolo de amplificación, un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 segundos, alineamiento a 62°C por 15 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos, y finalmente un ciclo de 72°C por 5 minutos.

Posteriormente, una alícuota de 4 µl de cada producto de amplificación se separó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% con solución TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8). El producto de la reacción fue visualizado utilizando el colorante GelRed (Biotium) en un fotodocumentador (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak, UK). Para determinar el tamaño de los



segmentos amplificados se empleó un marcador de peso molecular 100 pb (Bio-Rad EZ load molecular ruler).

3. RESULTADOS

Se estandarizaron las condiciones para la PCR de los tres pares de oligonucleótidos usados en este estudio (Tabla 1). Se evaluaron tres temperaturas de alineamiento, 58°C, 60°C y 62°C para cada uno de los pares de oligonucleótidos empleados, siendo mejor la eficiencia de la reacción a 62°C (Figura 1).

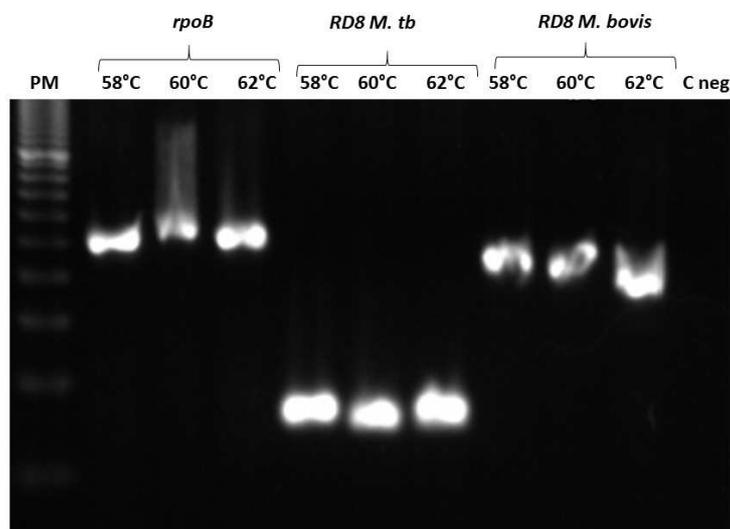


Figura 1. Gradiente de temperatura de la reacción de PCR para la amplificación de los genes *rpoB*, RD8 presente en *M. tuberculosis* y RD8 ausente en *M. bovis*. Se evaluaron tres temperaturas de alineamiento, 58°C, 60°C y 62°C.

| Tabla 1. Oligonucleótidos usados en este estudio | | | |
|--|----------------------|----------------------------------|---|
| Gen blanco | Producto de PCR (bp) | Oligonucleótidos | Secuencia |
| <i>rpoB</i> | 518 bp | <i>rpoB</i> -F <i>rpoB</i> -R | GCTGGACATCTACCGCAAGCTGC CAGCGGGTTGTTCTGGTCCATG |
| RD8 <i>M. tuberculosis</i> | 150 bp | RD8-F RD8-T-R | GTCGAAGCGGGGCGCTCT GCGCAACGGATTTCATCGT |
| RD8 <i>M. bovis</i> | 360 bp | RD8-F RD8-B-R | GTCGAAGCGGGGCGCTCT GGTTCTTGGCGTCTTGAAGG |

Posteriormente se evaluó la reacción de PCR al usar los tres pares de oligonucleótidos en una sola reacción, es decir, en una reacción multiplex. Esto con el objetivo de obtener un resultado que permita la identificación y diferenciación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en una sola reacción de PCR (Figura 2).



PM 1 2 3 4 5 6 PM

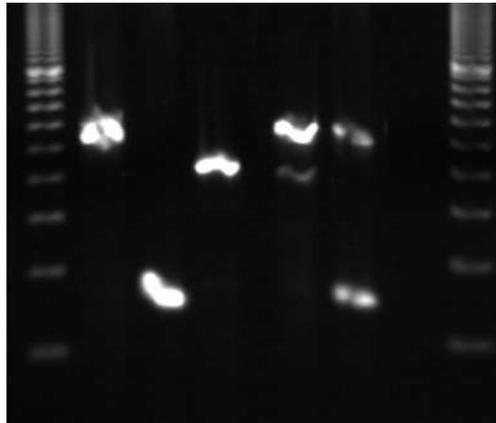


Figura 2. Estandarización de la reacción de PCR Multiplex para la diferenciación de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Carriles; 1: *rpoB* *M. tuberculosis* H37Rv. 2: RD8 *M. tuberculosis* H37Rv. 3: RD8 *M. bovis* AN5. 4: Multiplex *rpoB* + RD8 *M. bovis* AN5. 5. Multiplex *rpoB* + RD8 *M. tuberculosis* H37Rv. 6. Control negativo de reacción. PM: Marcador molecular de 100 pb.

4. CONCLUSIONES

Se diseñó un método de identificación y diferenciación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* al amplificar los genes *rpoB* y la región RD8 la cual está presente en cepas *M. tuberculosis* pero se encuentra ausente en cepas de *M. bovis*. El gen *rpoB* codifica el gen de la subunidad β de la RNA polimerasa y no solo facilita la identificación del genero *Mycobacterium spp*, sino también permite la diferenciación al nivel de especies a través de un análisis de restricción. Lo cual podría ser útil para verificar los resultados obtenidos con la amplificación de la región RD8. Por otra parte, la región RD8 se encuentra presente en cepas *M. tuberculosis* y *M. africanum* pero está ausente en cepas de *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti* y cepas de micobacterias no tuberculosas. Motivo por el cual, la región RD8 representa una región de gran interés para el diseño de métodos moleculares de identificación como el presentado en este estudio. Es de gran valor que el uso de estos tres pares de oligonucleótidos permita identificar y diferenciar entre cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en una sola reacción de PCR, lo cual disminuye los costos y tiempo en obtener un resultado. El siguiente paso en este proyecto de investigación es evaluar la utilización de este sistema multiplex en muestras de DNA obtenidas de esputo de pacientes sospechosos de padecer tuberculosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ernst DJ, Trevejo-Nuñez G, Banaiee N. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117(7):1738-45.
2. Milián-Suazo F, Pérez-Guerrero L, Arriaga-Díaz C. 2010. Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Prev Vet Med*.97:37-44.
3. Biet F, Boschirolí ML, Thorel MF, Guilloteau LA. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res*. 36:411-436.
4. Luo RF, Banaei N. Molecular approaches and biomarkers for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Lab. Med*. 2013; 33 (3):553-66.
5. Belisle J, Sonnenberg G. Isolation of Genomic DNA from *Mycobacteria*. In: Parish T, Stoker NG, editors. *Mycobacteria Protocols*. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 31-44.



6. Torres-Gonzalez P, Soberanis-Ramos O, Martinez-Gamboa A, Chavez-Mazari B, Barrios-Herrera MT, Torres-Rojas M, Cruz-Hervert LP, Garcia-Garcia L, Singh M, Gonzalez-Aguirre A, et al. 2013. Prevalence of Latent and Active Tuberculosis among Dairy Farm Workers Exposed to Cattle Infected by Mycobacterium bovis. PLoS Negl Trop Dis. 7:e2177.
7. Lee H, Park HJ, Cho SN, Bai GH, Kim SJ. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the rpoB gene. J Clin Microbiol 2000; 38:2966-71.