



ANÁLISIS AMPLIO DE GENOTIPOS DE *M. BOVIS* A PARTIR DE AISLADOS MEXICANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE VNTR

Elba Rodríguez-Hernández^a, Susana Flores Villalva^a, Germinal J. Cantó Alarcón^b, Feliciano Milián Suazo^b, Alejandro Nava Vargas^b, Yezenia Rubio Venegas^b.

^aCentro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal CENIDF y MA-INIFAP, rohe577@hotmail.com. ^bUniversidad Autónoma de Querétaro, gcanto07@uaq.mx, miliansf@yahoo.com.mx, alexnavavargas@hotmail.com, yez.rubio@hotmail.com.

Resumen

En México existen pocos reportes del estudio a gran escala de genotipos de *M. bovis* determinados mediante la técnica de VNTR (Número Variable de Repeticiones en Tandem), y en vista de que muchas regiones del país han sido poco exploradas a este respecto, en nuestro trabajo utilizando la técnica antes mencionada, realizamos la genotipificación de aislados provenientes de diferentes regiones del país. Obtuvimos datos de perfiles genotípicos de *M. bovis* que aportan información relevante sobre las diferencias genéticas de las cepas estudiadas, la relación entre ellas y su distribución; para cumplir con nuestro objetivo se muestrearon diferentes hatos lecheros de diversas regiones del país. Obtuvimos muestras de animales enviados a rastro a partir de tejido sospechoso a la infección con tuberculosis. Con las muestras analizadas identificamos alrededor de 451 perfiles genéticos de aislados de *M. bovis*; a estas mismas muestras previamente se les había tipificado mediante la técnica de espiligotipificación, así que realizamos la comparación y la relación entre ellos. Las muestras positivas fueron analizadas por VNTR utilizando 12 loci. Realizamos el análisis de longitud de fragmentos del producto de la PCR. Los perfiles obtenidos fueron capturados en Excel y se compararon filogenéticamente; utilizando el programa MIRU-VNTR *plus* para obtener los dendogramas. La diversidad alélica de los VNTR individualmente y en combinación fue calculada usando la siguiente ecuación $D=1-\sum x_i^2/[n/(n-1)]$. Los resultados demuestran que una colección de 12 MIRU-VNTR en combinación con resultados de espiligotipificación de estos aislados incrementa considerablemente el poder de discriminación entre cepas, con lo que se demuestra su eficacia; especialmente los loci 2461 ($D=0.857$) y 577 ($D=0.808$) como método de primera línea para el análisis de transmisión de la tuberculosis. Con los datos obtenidos de los perfiles de espiligotipificación y VNTR pudimos determinar la relación genética entre las cepas; comparar los perfiles y determinar sus diferencias.

1. Introducción

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad bacteriana crónica causada por *Mycobacterium bovis*, una bacteria patógena intracelular obligada que se caracteriza por producir granulomas en diferentes órganos, especialmente pulmones y nódulos linfáticos de varias especies animales y el hombre (Romero *et al.*, 2006). La tuberculosis afecta a la ganadería tanto a nivel de producción como en la calidad de sus productos, ya que causa aproximadamente una disminución en un 10 al 20% de leche y carne, por lo que es necesario establecer un control estricto sobre la tuberculosis bovina que permita a la ganadería nacional desarrollarse en mejores condiciones sanitarias



(Boland *et al.*, 2010). La aplicación de técnicas de biología molecular en la identificación de micobacterias aisladas a partir de medio líquido o sólido, permite establecer diagnósticos más rápidos y confiables (Maslow *et al.*, 1993; Kamerbeek *et al.*, 1997). La mayor parte de las técnicas comercializadas se basan en la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de secuencias génicas específicas del género *Mycobacterium* que son de utilidad para distinguir los miembros del complejo de *M. tuberculosis* de otras micobacterias. Algunos de los métodos que se emplean para el estudio de la epidemiología molecular de la TB son el análisis por VNTR y la determinación de espigotipos (Milian-Suazo *et al.*, 2008, Frothingham *et al.*, 1998). En este trabajo, se determinó el perfil genotípico de aislados de *M. bovis* para comprender con detalle la epidemiología de la enfermedad y establecer con ello las rutas de infección que marcarán la pauta para considerar nuevas estrategias de control y erradicación de la tuberculosis bovina.

2. Material y métodos

La identificación de los genotipos a partir de aislados de *M. bovis* mediante VNTR se realizó con una serie de 12 iniciadores específicos; como controles positivos se utilizaron las cepas H37Rv y AN5.

Extracción de ADN: Las reacciones de PCR se realizaron a partir de ADN extraído de los aislados obtenidos; utilizamos 100 mg del aislado en cultivo que fue colocado en 0.2 ml de amortiguador TE 1X y se incubó en baño María a 95 °C durante 45 minutos. Posteriormente se realizó la cuantificación del ADN en un espectrofotómetro y se evaluó la calidad del ADN en un gel de agarosa al 1% que fue electroforado a 70 V.

Preparación de las reacciones: Los iniciadores se reconstituyeron en agua libre de nucleasas para tener una solución de almacenaje a una concentración final de 200 µM, y se realizaron alícuotas que se almacenaron a -20°C protegidas de la luz. La alícuota que se descongeló para su uso fue guardada a 4°C. La reacción de PCR fue realizada en un termociclador a un volumen final de 10 µl; cada tubo de reacción fue preparado con 1.25 U de Taq polimerasa; 2.5 mM de MgCl₂; amortiguador 1x; 1 µl de DMSO, 4 mM de dNTP's, 1 µM de iniciador sentido y 1 µM de iniciador antisentido, 2.0 µl de ADN y el volumen fue ajustado con agua libre de nucleasas. Las reacciones de PCR fueron sometidas a un protocolo de termociclado, compuesto por una etapa de desnaturalización de 95 °C/10 minutos; una etapa de amplificación de 35 ciclos a 95 °C/30 segundos, 55 °C/1 minuto, 75 °C/1:30 minutos, y finalmente a 75 °C/10 minutos.

Evaluación de los VNTR's en geles de agarosa: La evaluación de los fragmentos se realizó mediante un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 3%, teñido con 1.5 µl de bromuro de etidio para separar fragmentos en un rango de 50 pb a 1,000 pb ó al 1% para separar fragmentos mayores a 1,000 pb. A los fragmentos obtenidos se les evaluó el tamaño del producto para obtener el número de copias y generar un código numérico que representará las veces que se encuentra expresado un locus en particular en cada uno de los aislados y se generó el genotipo correspondiente. Los perfiles genotípicos fueron analizados en el programa MIRU-VNTR_{plus}.



Resultados

En este trabajo mediante la técnica de VNTR determinamos los perfiles genotípicos de aislados de *M. bovis*, provenientes de hatos lecheros de diferentes regiones del país, entre las que se encuentran Querétaro, Estado de México, Guanajuato, Aguascalientes, Coahuila, Hidalgo, Michoacán, Jalisco, Baja California, San Luis Potosí, Nuevo León, Chiapas, Zacatecas, Chihuahua, Durango, Nayarit y Colima. Identificamos alrededor de 451 perfiles genéticos de aislados de *M. bovis*. Los loci que mostraron mayor poder de discriminación fueron 4052, 577, 2165 y 2461; mientras que los de mayor polimorfismo fueron 2995 y 2461. Obtuvimos 451 perfiles alélicos, lo que corresponde a muestras con diferente número de copias en al menos un locus de los analizados. Estos perfiles alélicos fueron determinados mediante 12 loci (VNTR), y se obtuvo una diversidad alélica (poder de discriminación) de 0.999, de todos los aislados analizados se obtuvieron un total de 451 perfiles diferentes (número de copias de cada locus para todas las muestras). La diversidad alélica o poder de discriminación (D) obtenida para cada uno de los loci fue de entre 0.239 hasta 0.857 (Cuadro 1). Los resultados muestran que los loci con mayor poder de discriminación fueron el 2461 (D=0.857) y 577 (D=0.808), mientras que los loci 4052 (D=0.737), 2165 (D=0.737), 3192 (D=0.514), 1955 (D=0.655), 1644 (D=0.6719), 2163b (D=0.694), 424 (D=0.596), 2401 (D=0.613) y 2995 (D=0.718) mostraron un poder de discriminación moderado. El loci 2686 (D=0.239) fue el que mostró el menor poder de discriminación de todos.

Cuadro 1. Diversidad alélica de cada VNTR de los aislados de *M. bovis* analizados

VNTR	Número de repetidos para cada perfil alélico por VNTR									D
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
3192	19	43	307	98						0.514
2686	16	2	406	18	25					0.239
1955	66	21	59	262	59					0.655
1644	117	4	163	177	5	1				0.6719
4052	49	9	99	133	166	11				0.737
577	121	*	43	77	65	123	36	2		0.804
2163b	43	13	89	84	223	14	1	*	*	0.694
2165	193	10	11	53	34	118	48	*	*	0.737
424	109	*	70	15	267	6	*	*	*	0.596
2401	55	7	84	269	45	*	3	4	*	0.613
2995	7	22	24	66	124	201	21	2	*	0.718
2461	55	47	7	69	82	88	73	33	13	0.857

D: Diversidad alélica (Poder de discriminación)

El análisis filogenético de los perfiles obtenidos con los 12 loci mencionados reveló un dendograma en el que podemos identificar dos grandes grupos clonales. Un grupo conformado solo por 77 aislados; este grupo a su vez está dividido en 2 subgrupos, uno conformado en su mayoría por aislados de Coahuila y un aislado de Aguascalientes y uno de zacatecas (esto puede deberse a una cepa poco representada y exclusiva de dicha región o al bajo número de muestras analizadas); el otro subgrupo conformado en su mayoría por aislados de Zacatecas. Por otra parte, en el grupo restante se concentran 392 aislados, y este también se divide en dos subgrupos. Un subgrupo dividido en dos racimos donde predominan aislados de Jalisco e Hidalgo respectivamente, lo que sugiere que estas cepas son exclusivas de dichas regiones, cabe mencionar que dentro de los aislados de Hidalgo se encontró el mayor número de genotipos compartidos (4 aislados con genotipos idénticos) con perfil de espilogotipificación idéntico (Figura 1).



Figura 1. Dendrograma representativo de los aislados de *M. bovis* obtenidos de diferentes estados de la republica.



Los perfiles fueron analizados usando 12 loci: 2461, 577, 4052, 2165, 3192, 1955, 1644, 2163b, 424, 2401, 2995, 2686.

Discusión y conclusión

Actualmente la genotipificación de aislados de *M. bovis* ha cobrado notable importancia a nivel mundial, debido a que con esos resultados y con datos obtenidos de la epidemiología clásica es posible determinar fuentes de infección y diseminación no solo de *M. bovis* sino de cualquier integrante del complejo *M. tuberculosis*. Bajo esta premisa se puede concluir que las cepas de *M. bovis* con genotipo idéntico proceden del mismo origen, y que cepas con diferente genotipo provienen de un lugar distinto o tienen distinto origen de infección, con estos datos por ejemplo podríamos determinar si un bovino de reciente adquisición en alguna unidad ganadera es causante del brote de tuberculosis (Aminian et al., 2009). Con el análisis de identificación molecular, se determino la presencia de *M. bovis* en muestras de animales sospechosos con tuberculosis de varios estados de la republica mexicana, lo cual indica la existencia de infecciones por tuberculosis en hatos lecheros de México. Este estudio de 12 MIRU-VNTR en combinación con resultados de espoligotipificación de estos mismos aislados incrementa considerablemente el poder de discriminación entre cepas, con lo que se demuestra la eficiencia del uso de 12 MIRU-VNTR especialmente los loci 2461 (D=0.857) y 577 (D=0.808) como método de primera línea para el análisis de transmisión de la tuberculosis. Con los datos obtenidos de los perfiles de espoligotipificación y VNTR pudimos determinar la verdadera relación genética entre las cepas; comparar los perfiles y determinar sus diferencias. Con esos datos hemos podido determinar las



regiones del país donde se ha diseminado *M. bovis* mediante el seguimiento de genotipos idénticos en las regiones y determinar que existe una gran variabilidad de genotipos que no son compartidos al menos en las regiones estudiadas, lo que significa que para determinar los focos de infección de la enfermedad es necesario aumentar el número de aislados de ciertas regiones y emparar los datos con la información epidemiológica clásica. A futuro, estos datos serán una herramienta útil en casos específicos dentro de la campaña para el control y erradicación de la tuberculosis bovina en México (Roring et al., 2004). Los datos obtenidos en este trabajo son una primera aproximación para conocer los genotipos de *M. bovis* presentes en el país, sin embargo faltan estudios amplios e interdisciplinarios para obtener datos suficientes que ayuden al diseño de estrategias novedosas en las campañas de control y erradicación de la tuberculosis en México.

Este trabajo fue apoyado parcialmente con recursos del CONACyT con el acuerdo FORCECYT/5SEXT/2012/11/06-03 (clave 193512).

Bibliografía

1. Aminian M., Sabbeer A., Bennett P. 2009. Determination of major lineages of *Mycobacterium tuberculosis* complex using Mycobacterial interspersed repetitive units. IEEE Int Conf Bioinform Biomed. 338-343.
2. Boland, F., Kelly, G.E., Good, M., More, S.J. 2010. Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. Prev. Vet. Med. 93: 153-161.
3. Frothingham R., Meeker-O'Connell W.A., (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology 144:1189–1196
4. Kamerbeek J., L. Schouls., A. Kolk., M. Van A., V. Soolingen D., S. Kuijper., A. Bunschoten., H. Molhuizen., R. Shaw., M. Goyal., V. Embden J (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 35: 907-914.
5. Maslow J, Mulligan M, Arbeit R (1993). Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin Infect Dis; 17:153-162
6. Milián-Suazo, F., Harris, B., Arriaga, D.C., Romero, T.C., Stuber, T., Alvarez, O.G., Morales, L.A., Perez, S.M., Payeur, J.B. 2008. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: Usefulness in international trade. Preventive Veterinary Medicine. 87:261–271.
7. Romero, B., Aranaz, A., de Juan, L., Alvarez, J., Bezos, J., Mateos, A., Gómez-Mampaso, E., Domínguez, L. 2006. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same profile as isolates from animals. J Clin Microbiol. (449): 3405-3408.
8. Roring S., Alistair S., Hewinson G., Neill D., Robon S (2004). Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. Vet Microbiol 101:65-73.