



Evaluación de un sistema optimizado de tipificación MIRU-VNTRs para estudios de epidemiología molecular de Tuberculosis en Bolivia.

VASQUEZ MICHEL, ANETH¹

LUNA BARRÓN, RUDDY²

TORRES, EMMA³

CORRESPONDENCIA: MSC. ANETH VASQUEZ MICHEL

TELF. 70103933 / 2786007

ANETHVASQUEZ@YAHOO.ES

Resumen

El Programa Nacional de Tuberculosis en Bolivia basa sus parámetros de control en métodos de epidemiología clásica; actualmente la Genética Molecular logra datos precisos mediante la aplicación de la epidemiología molecular, estudiado la dinámica de transmisión, permitiendo conocer fuentes y áreas afectadas en la transmisión, mejorando la comprensión de factores involucrados en la epidemiología de la Tuberculosis (TB). La Mycobacteriología molecular actualmente facilita el análisis y comparaciones entre bases de datos por medio de secuenciación automática.

El presente estudio pretende evaluar un sistema optimizado de tipificación MIRU-VNTRs (Unidades repetitivas interespaciadas de Mycobacterias) para estudios de

Abstract

The National Tuberculosis Programme in Bolivia control parameters are based on conventional epidemiological methods; Molecular Genetics currently manages accurate data through the application of molecular epidemiology, transmission dynamics studied, allowing knowledge sources and transmission affected areas, improving understanding of factors involved in the epidemiology of tuberculosis (TB). The molecular Mycobacteriology currently facilitates analysis and comparisons between databases using automated sequencing.

This study aims to evaluate a optimized system MIRU-VNTR typing (Mycobacterium interspersed repetitive units) for molecular epidemiology studies of tuberculosis in Bolivia.

1 Investigador Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Docente Investigador Instituto SELADIS, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés

2 Perito Investigador del Centro de Investigación Genética del Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Universidad Policial

3 Investigadora Adjunta del Centro de Investigación Genética del Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Universidad Policial

epidemiología molecular de Tuberculosis en Bolivia.

Se colectaron 85 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de 8 departamentos de Bolivia. Se realizó la caracterización de estas cepas, mediante PCR multiplex, utilizando seis marcadores MIRU-VNTR específicos, considerando los complejos A (loci 4,26,40) y complejos B (loci 10,16,31) y se llevó a cabo la genotipificación por electroforesis capilar. Posteriormente se evaluó la variabilidad de genotipos entre cepas de los 8 departamentos y se establecieron las bases para la construcción de árboles filogenéticos con las poblaciones estudiadas.

La tipificación de cepas de *M. tuberculosis* obtenidas y la estructura genética de las mismas, establecida a través de frecuencias alélicas de los MIRU analizados indica que existe una evolución independiente de las cepas de *M. tuberculosis* en los departamentos de Oruro, La Paz, Santa Cruz, Chuquisaca y Potosí, siendo el departamento de Oruro el más relacionado a la cepa control (H37Rv), Por otro lado, en los departamentos de Cochabamba y Beni, las cepas muestran una relación evolutiva cercana, lo que es indicio de un proceso de migración entre estos departamentos.

El análisis filogenético basado en el perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de *M. tuberculosis* muestra un proceso de evolución diferencial en cada una de las cepas evaluadas, siendo las cepas del departamento de La Paz las más relacionadas a las características de la cepa control.

We collected 85 *Mycobacterium tuberculosis* strains from 8 departments of Bolivia. We fulfill the characterization of these strains by multiplex PCR, using six markers specific MIRU-VNTR, considering the complex A (4,26,40 loci) and complex B (loci 10,16,31) and conducted genotyping by capillary electrophoresis. Then we assessed the variability of genotypes between strains of the 8 departments and established the basis for the construction of phylogenetic trees with the populations studied.

The genotype strains of *M. tuberculosis* obtained and their genetic structures established by MIRU allelic frequencies analyzed, indicates an independent evolution of strains of *M. tuberculosis* in the departments of Oruro, La Paz, Santa Cruz, Chuquisaca and Potosí, Oruro department being more related to the control strain (H37Rv), on the other hand, in the departments of Cochabamba and Beni, strains show a close evolutionary pattern, which is indicative of a migration between these departments.

Phylogenetic analysis based on the antibiotic resistance profile of *M. tuberculosis* strains shows a differential evolution process in each of the tested strains, being La Paz department strains mostly related to the characteristics of the control strains.

PALABRAS CLAVE

Mycobacterium tuberculosis, Epidemiología Molecular, Unidades Repetitivas interespaciadas de *mycobacterium* (MIRU), PCR multiplex,, electroforesis capilar, árbol filogenético, evolución.

KEY WORDS

Mycobacterium tuberculosis, Molecular Epidemiology, Genotyping, *Mycobacterium* interspersed repetitive units (MIRU), multiplex PCR, alleles, capillary electrophoresis, phylogenetic tree, evolution.

INTRODUCCION

De acuerdo con últimos informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 9,4 millones de personas en el mundo resultaron infectadas con TB entre los años 2010 -2011 y 1,7 millones murieron por esta causa, entre las que se incluyen 380.000 personas con TB asociada a VIH. La mayoría de los casos en las Américas se dan en Haití, Surinam, Bolivia, Guyana y Perú (OMS,2012-Wright, A. 2009). Bolivia es el tercer país más afectado en el continente Americano. De acuerdo a los datos de la OMS, el país presenta 20.200 casos de TB con una incidencia de 110 nuevos casos de baciloscopía positiva por 100.000 habitantes (Wright, A. 2009)

Por muchos años, el Programa Nacional de Tuberculosis en nuestro país se ha basado en la epidemiología clásica para determinar ciertos parámetros de control de este mal. Sin embargo, en la actualidad, con el advenimiento de la era de la Genética nuestro entendimiento acerca de la dinámica de transmisión ha sido aclarado gracias a la genotipificación de cepas de *M. tuberculosis* que permite profundizar significativamente aspectos de la transmisión de la enfermedad, además de conocer la diversidad genética de las cepas, estructura poblacional y sobretodo la distribución geográfica de las mismas, que adjunta a la epidemiología clásica constituyen una gran herramienta tanto para la vigilancia como para un control adecuado de la TB, sin olvidarnos que además estos estudios se aplican a la práctica clínica.

En los últimos años el aumento en las migraciones de países endémicos hacia países industrializados, así como el aumento de los casos de VIH, han contribuido a la re- emergencia de esta enfermedad en países en los cuales este estaba erradicado. Es por ello que el control eficiente de la enfermedad debe ser logrado no solo a través de sistemas de Vigilancia Nacional sino a través de sistemas de vigilancia epidemiológica internacionales capaces de monitorear con precisión las tendencias epidémicas a nivel global.

En este estudio proponemos la evaluación de un sistema optimizado para la genotipificación de *M. tuberculosis* mediante el análisis de loci genómicos que contienen secuencias con repeticiones en tándem (VNTRs). Usando este enfoque las cepas pueden ser tipificadas por códigos correspondientes al número de VNTRs en diferentes loci que contienen elementos genéticos llamados unidades repetitivas interespaciadas de mycobacterium (MIRU), creando bases de datos electrónicas que pueden ser fácilmente intercambiadas y compartidas entre diferentes laboratorios por lo cual se constituye en un método altamente apropiado para estudios epidemiológicos a nivel mundial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas en el estudio

En el marco del acuerdo Interinstitucional entre la FCFB e INLASA; se solicitó al Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, se nos proporcionó de la colección (cepario); 85 cepas disponibles como resultado de los aislamientos realizados durante los años 2009-2010. Las cepas fueron aisladas en medio de Lowenstein Jensen, procedentes de muestras clínicas envia-

das para pruebas de susceptibilidad a antituberculosos, de diferentes departamentos de Bolivia.

Para poder contar con el número de cepas a estudiar, fue necesario realizar un artificio que garantice una selección aleatoria, cuya limitante se originaba en el número de cepas a “poder analizar” que estaba en función de la limitante económica, El número de muestras por departamento obedeció a alguna determinante aleatoria, la que a su vez se justifique con algún indicador y puedan hacerse estimaciones proporcionales a datos de incidencia.

El procesamiento de las muestras se llevo a cabo en los Laboratorios de la Unidad de Bioquímica Molecular del IIFB (Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas) y en Laboratorios del Centro de Investigación Genética del Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Universidad Policial.

Obtención de ADN genómico

El sistema de tipificación automatizado de MIRU-VNTR se desarrolló usando colonias de *M. tuberculosis* tratadas con ebullición y purificadas mediante la optimización de un método químico consistente en un kit de obtención de ADN genómico *Wizard Genomic DNA Purification* (PROMEGA).

Amplificación de MIRU- VNTRs - Multiplex PCR

Se realizó la caracterización de las cepas de *M. tuberculosis*, utilizando seis marcadores MIRU-VNTR específicos, considerándose los complejos A (loci 4,26,40) y complejos B (loci 10,16,31) de acuerdo al protocolo y cebadores propuestos por Supply et al. (Supply, 2001)

Los oligonucleótidos usados para la PCR correspondieron a las regiones flanqueantes del loci polimórfico MIRU-VNTR identificado en el genoma *M.tuberculosis* H37Rv

(Mazars,2001- Van Embden,1993), la misma que se utilizó en este estudio para comparar los diferentes perfiles obtenidos, para cada mezcla de PCR multiplex, un primer de cada oligonucleótido fue marcado con un fluorocromo diferente.

El programa del termociclador para las dos reacciones multiplex fue el mismo. La PCR se llevo a cabo usando un termociclador (Hybaid, Ashford, Great Britain), comenzando con un paso de desnaturalización de 15 minutos a 95°, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1min a 59°C y 30 seg a 72°C. Los controles negativos estuvieron constituidos por mezclas de reacción sin ADN de mycobacterium (Van Embden, 1993).

Análisis de Minisatélites

Los fragmentos de MIRU VNTRs obtenidos fueron sometidos a electroforesis capilar en el Analizador Genético AB3130. Posteriormente, estos fragmentos, marcados con los fluoróforos FAM, TET y HEX, se analizaron a través del programa GeneMapper, lográndose la identificación de los alelos respectivos para cada marcador, en cada cepa. La asignación de alelos se realizó una vez determinados los pesos en comparación con el marcador de peso LIZ y la bibliografía descrita (Supply, 2001).

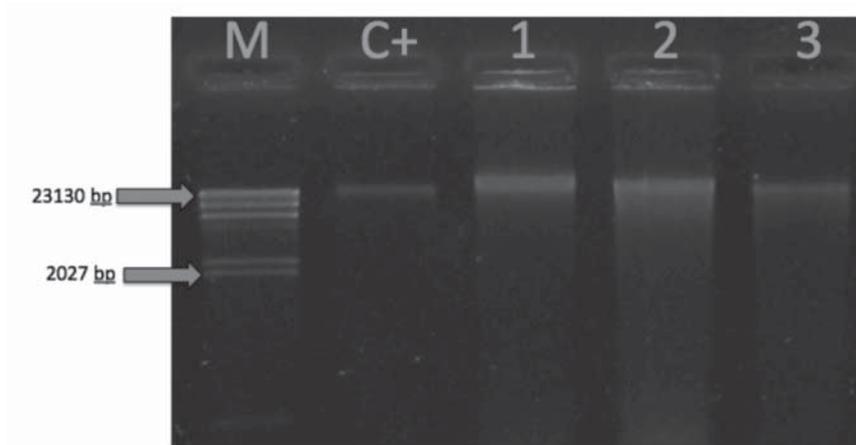
RESULTADOS

La optimización del método de extracción y purificación de ADN, Wizard Genomic Purification, permitió la obtención de fragmentos de ADN en calidad y cantidad suficiente para los ensayos subsecuentes (Fig.1).

Figura 1

Corrida electroforética en gel de agarosa al 1%

Extractos de ADN total de las cepas analizadas revelados con envirosafe. M: Marcador de peso Lambda ADN/HindIII, C+: Control Positivo de ADN, 1,2,3: ADN obtenido con kit Wizard (PROMEGA)

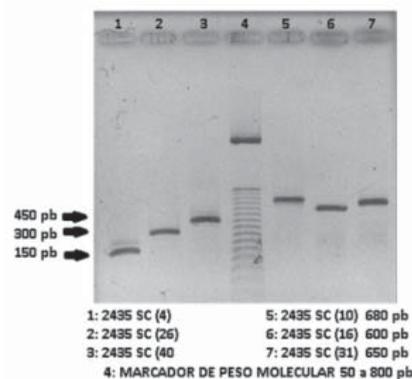


Identificación de alelos de MIRUS VNTRs

La amplificación de los complejos A y B propuestos por Supply y colaboradores (Mazars,2001) permitió la obtención de 6 fragmentos específicos cuyo peso varía de cepa a cepa de acuerdo a sus características de polimorfismo (Fig. 2).

Figura 2

Corrida electroforética de los 6 fragmentos de MIRU VNTRs obtenidos a partir del protocolo desarrollado por Supply y colaboradores (2001).



Así, el número de alelos obtenidos en la población total para los seis loci evaluados fue de 18, presentando cada uno de ellos al menos dos variantes (Tabla 1).

Tabla 1
Frecuencias alélicas de los marcadores

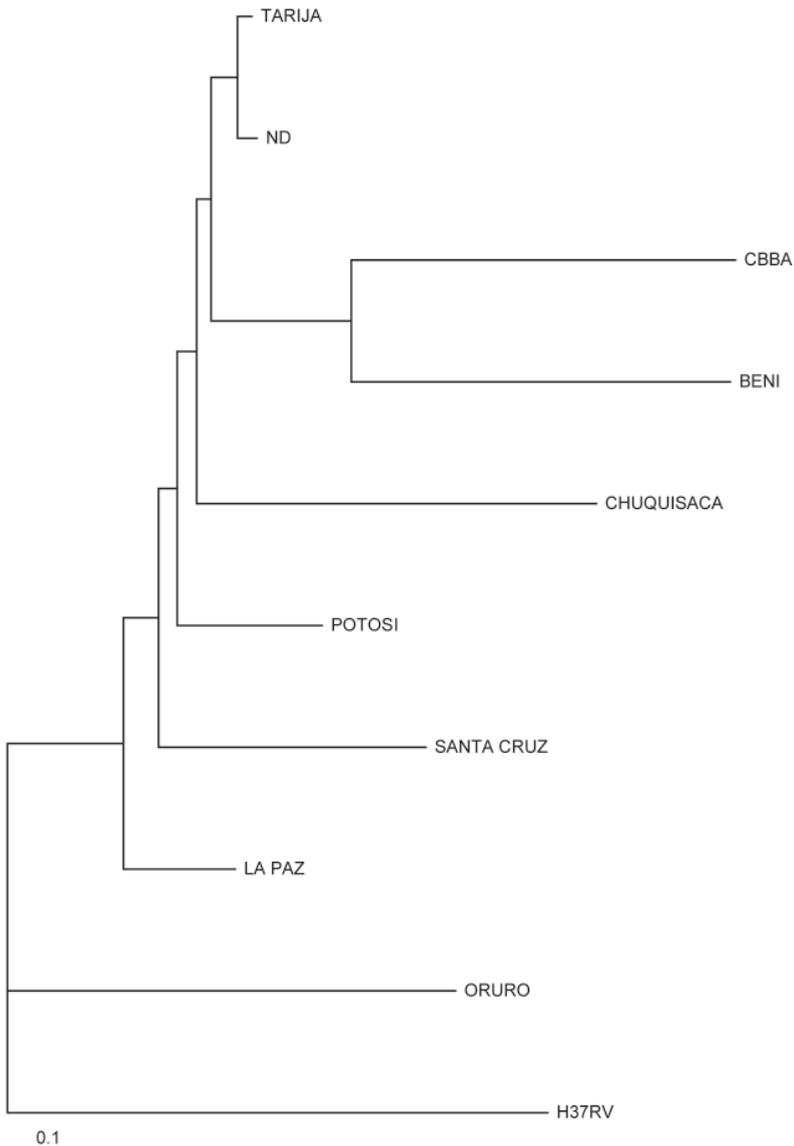
MIRU	ALELO	FRECUENCIA
LOCUS10	1	0,305084745762712
LOCUS10	2	0,694915254237288
LOCUS16	1	0,23728813559322
LOCUS16	2	0,76271186440678
LOCUS31	1	0,152542372881356
LOCUS31	2	0,847457627118644
LOCUS4	1	0,949152542372881
LOCUS4	2	0,0338983050847458
LOCUS4	3	0,0169491525423729
LOCUS26	1	0,245614035087719
LOCUS26	2	0,175438596491228
LOCUS26	3	0,508771929824561
LOCUS26	4	0,0526315789473684
LOCUS26	5	0,0175438596491228
LOCUS40	1	0,258620689655172
LOCUS40	2	0,482758620689655
LOCUS40	3	0,155172413793103
LOCUS40	4	0,103448275862069

Análisis de la estructura genética de los MIRU-VNTRs

En esta investigación preliminar, el análisis de los alelos obtenidos en los seis marcadores VNTRs analizados en las 85 cepas estudiadas, permitió el establecimiento de su estructura genética a través de sus frecuencias alélicas, las cuáles, traducidas a distancia genética permitieron la construcción de un árbol filogenético a través del cuál es posible analizar la relación de las cepas entre los diferentes departamentos en función a la cepa control (H37Rv) (Fig. 3).

Figura 3

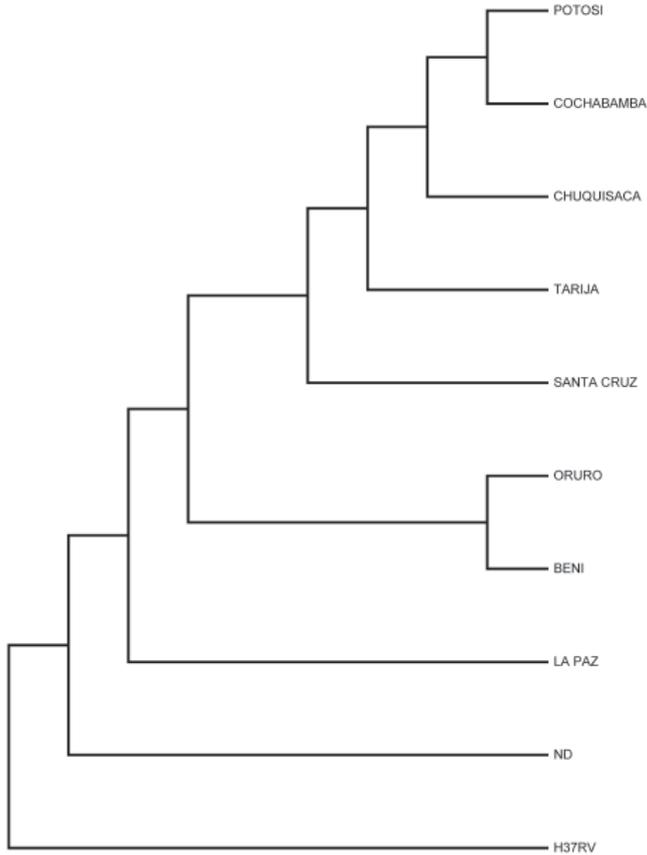
Árbol filogenético en base al análisis de 6 marcadores MIRU- VNTRs de las cepas de *M. tuberculosis* analizadas por departamento en función a su estructura genética y de acuerdo al modelo de Slatkin, donde H37Rv es la cepa control o de referencia ATCC (grupo externo).



Por otro lado, analizando la relación filogenética de las cepas estudiadas en función a su perfil de resistencia a antibióticos (Fig.4), se observa que las cepas con menor resistencia se encuentran en el departamento de La Paz, mientras que las resistentes en Potosí y Cochabamba.

Figura 4

Árbol filogenético de resistencia de la cepas de *M. tuberculosis* analizadas en los diferentes departamentos, donde H37Rv es la cepa control o de referencia ATCC (grupo externo).



DISCUSIONES

La evaluación de un sistema optimizado de tipificación de 6 loci MIRU-VNTR propuesto en este estudio representa una aproximación bastante eficaz a la genotipificación de alta resolución de aislamientos de *M. tuberculosis*. Este utiliza una PCR multiplex con primers marcados con fluorocromos para analizar 2 dos grupos de 3 loci de MIRU-VNTR simultáneamente y provee un sistema automatizado necesario actualmente para la producción y manejo rápidos de los datos de genotipificación.

Datos bibliográficos revelan que la tipificación de MIRU-VNTR es 100% reproducible, sensible y específico para aislamientos del complejo *M. tuberculosis*, rendimiento que no ha sido alcanzado por ningún otro método utilizado con propósitos de tipificación, incluyendo RFLP IS6110, probado en las mismas condiciones (Cohn, 1998). Es más, el poder de discriminación de la tipificación por MIRU-VNTR rindió mejor que otros métodos basados en RFLP u otros métodos basados en tipificación por PCR-IS6110- independiente (Cohn, 1998- Frothingham, 1998- Kremer, 1999).

Enfocándonos plenamente a lo que se refiere a la identificación de los alelos MIRU-VNTR, definimos que la menor frecuencia se presentó en el alelo 3 del locus 4, mientras que la mayor en el alelo 1 locus 4. En general, los seis loci estudiados son informativos para la identificación filogenética de los linajes de *M. tuberculosis*. Sin embargo, hay loci que parecen haber tenido una tasa evolutiva baja, o donde recientemente se están presentando procesos evolutivos, como es el caso de los locus 4 y 31, pues de no haberse reportado en ellos los alelos 1 y 2, respectivamente, estos no serían de gran utilidad para el establecimiento de líneas evolutivas (tabla 1).

Así, los alelos y las frecuencias encontradas muestran que los seis loci analizados presentan la suficiente variabilidad para distinguir cepas no relacionadas y estabilidad clonal para identificar una misma cepa y seguir la cadena de transmisión, aspectos de gran importancia de acuerdo a lo planteado por Supply et al. (Supply, 2001- Supply, 2006). Es en base a esto, que nuestro árbol (fig. 3), muestra que las cepas provenientes de la población orureña son las más relacionadas a la cepa control (cepa sensible a todo el espectro de antibióticos utilizados para el tratamiento de la tuberculosis), siendo su estructura genética única, pues no muestran relación con otras cepas del país, lo que podría indicar que en esta población, *M. tuberculosis* no está sometida a flujo génico o que no existen migrantes con otro genotipo de cepas.

Por otro lado, las cepas de La Paz, Santa Cruz, Potosí, Chuquisaca, Beni, Cochabamba y Tarija, se encuentran en un clado diferente al de Oruro, siendo las cepas genéticamente más diferentes, aquéllas pertenecientes al departamento de Tarija. Asimismo, las cepas de Beni y Cochabamba muestran una estrecha relación, lo que puede ser indicativo de un proceso de migración entre estos departamentos que llevó a una evolución conjunta de sus cepas de *M. tuberculosis*. En suma, en este árbol también es posible identificar a las cepas de La Paz en clado distinto al de los restantes departamentos. Sin embargo, es necesario mencionar que, al ser éste un estudio preliminar, pues solo involucra seis loci, la variación entre cepas puede incrementarse en más del 50%, lo que no necesariamente indicaría que los clados conformados se modificarían, pues ya se ha demostrado que los MIRU tienen una evolución convergente (Supply, 2006).

En el análisis de la relación filogenética comparando la filogenia obtenida a partir del perfil de resistencia con aquélla establecida a través de la estructura genética dada por el análisis de MIRU-VNTRs (fig 4), se observó que no existe una relación a priori entre resistencia y evolución de las cepas en los distintos departamentos, lo que podría indicar que no existe un efecto de los antibióticos en la evolución a este nivel. Sin embargo, para rastrear los eventos evolutivos independientes en las distintas cepas en los 8 departamentos de Bolivia que puedan ligarse a estudios epidemiológicos y tal vez, más certeramente al perfil de resistencia de estas cepas, es necesaria la evaluación de estas poblaciones con aproximadamente 18 loci. Pues de acuerdo a (Supply et al - 2001- Monteserin, 2013) una comparación y evaluación precisa puede realizarse sólo a este nivel.

Finalmente concluimos que la aplicación del sistema MIRU-VNTRs en cepas de *M. tuberculosis* provenientes de ocho departamentos del país, permite la identificación y tipificación de las mismas, estableciendo sus linajes, mismos que permiten rastrear las cepas de mayor resistencia en el territorio nacional. Estos resultados demuestran la capacidad de nuestros laboratorios e investiga-

dores para desarrollar y aplicar esta tecnología y la factibilidad, a través del Programa Nacional de Tuberculosis, para llevar a cabo este tipo de estudios que son de gran interés en nuestro medio, de manera que su análisis objetivo pueda coadyuvar al Programa en el establecimiento de políticas de control e información. Es en este sentido, que concluida exitosamente esta evaluación, se analizaron los 6 loci propuestos para la genotipificación de este microorganismo.

Estudios futuros, mayor número de muestras y una tipificación de mayor complejidad son necesarios para establecer un patrón regionalizado, de manera que nos permita asignar el origen en aislamientos provenientes de pacientes.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración del Dr. Antonio Flores Serna, por su apoyo logístico y coordinación administrativa en el proyecto del que es parte la presente investigación.

A la Dra. Mirtha Camacho y todo el equipo de profesionales y colaboradores del Laboratorio de Referencia Nacional de Control de la Tuberculosis (IN-LASA), por su apoyo incondicional al facilitarnos las cepas para este estudio.

A La Dra. María Teresa Alvarez responsable de la Unidad de Bioquímica Molecular del IIFB, donde se llevo a cabo el proyecto, por su amistad, lealtad y apoyo en todo momento

A las Lic. Silvana Limache Valderrama, Lic. Julia Molina Orihuela, Lic. Dina Quispe Mamani y la Lic. Daniela Arteaga Voight, quienes coadyuvaron al desarrollo del trabajo de laboratorio, así como al análisis y revisión de esta investigación.

REFERENCIAS

- Cohn L. The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for epidemiological studies of tuberculosis in developing countries. *Int J Tuber Lung Dis.* 1998;2:16-26.
- Frothingham, R., Meeker-O'Connell, WA. (1998). Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 144 (pt5), 1189-96.
- Kremer, K. & Van Soolingen, D. (1999). Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (8), 2607-18.
- Mazars, E., Lesjean, S. & Banuls, A. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology. (2001) *Proc Natl Acad Sci*, 98 (2), 1901-6.
- Organizacion Mundial de la Salud (2012). *Global tuberculosis control: epidemiology strategy financing*. Geneva.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., Locht, C. (2001) Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001: 39 (10), 3563 - 71.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsch-Gerdes, S., Willery, E., Van Soolingen, D. (2006) Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (12), 4498 - 4510.
- Van Embden J, Cave M, Crawford J, et al. (1993) Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(2): 406-9.
- Wright, A., Zignol, M., & Van Deun, A. (2009). Epidemiology of antituberculosis drug resistance: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *Lancet*, 373, 1861-73.
- Monteserin, J., Camacho M., Barrera, L. & Palomino, J.C. (2013). Genotypes of Mycobacterium tuberculosis in patients at risk of drug resistance in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution*, 17, 195-201.