

Número. Núcleo

Genotipificación por MIRU-VNTR de aislados de *Mycobacterium tuberculosis* remitidos al Hospital Km 81 en el año 2008

Duarte Fleitas, Mara Melissa; maramelissa@hotmail.com; Díaz Acosta, Chyntia Carolina; chyntiacarolinadiaz@gmail.com; Russomando Álvarez, Graciela Mabel; grusso@rieder.net.py

Universidad Nacional de Asunción – Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que aún constituye un problema de salud pública en Paraguay. Este estudio piloto de tipo observacional descriptivo de corte transversal tuvo como objetivo caracterizar aislados de Mtb mediante la técnica molecular “*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats*” (MIRU-VNTR). Se han utilizado 19 aislados colectados durante el 2008 en el Hospital Km 81, departamento de Cordillera. Las muestras fueron sometidas a amplificación de 12 loci MIRU-VNTR seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida. Los patrones genéticos fueron clasificados haciendo uso de la herramienta bioinformática MIRU-VNTR_{plus}. El Índice de Diversidad de Hunter Gaston (HGDI) determinó que los loci MIRU 10 y MIRU 40 presentaron el mayor poder discriminatorio. Se encontraron 4 cepas en 2 clados con 100% de similitud. Además, se hallaron 12/19 cepas en 4 clados con 80% de similitud. Estudios adicionales son necesarios para determinar asociaciones epidemiológicas. MIRU-VNTR agrupó las cepas estudiadas con miembros de las familias LAM, Haarlem y X con predominio de la familia LAM (79%).

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, MIRU-VNTR, genotipificación.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que afecta preferencialmente a los pulmones, aunque se puede alojar en locaciones extra pulmonares. A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó un número de incidencia de 10,4 millones. Aproximadamente 10% de dichos casos representan casos de co-infección TB y Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). A nivel regional se reportó una incidencia de 27/100.000 habitantes con 235.535 nuevos casos en la Región de las Américas. Con respecto a Paraguay, la tasa de incidencia se encuentra alrededor de 42/100.000 habitantes con 2.611 casos nuevos en el año 2016. Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen un riesgo de enfermar de 10% a lo largo de la vida, en cambio, el riesgo es mayor en personas con VIH, desnutridos, diabéticos y fumadores (WHO, 2017).

El abordaje convencional para el diagnóstico laboratorial de la TB es la bacterioscopía con coloración de Ziehl-Neelsen, una metodología rápida con baja sensibilidad y que no permite la diferenciación de especies. El cultivo en medios sólidos convencionales presenta mayor sensibilidad pero requiere mucho tiempo para obtener crecimiento. Con la llegada de métodos automatizados la cantidad de cultivos positivos aumentó y se redujo el tiempo de detección. En el año 2010, la OMS recomendó por vez primera la utilización de una prueba molecular que en 2 horas detecta de manera simultánea a Mtb y la resistencia a la rifampicina, el uso de la prueba denominada Xpert MTB/RIF® se ha extendido considerablemente en los últimos años (WHO, 2017).

La diferenciación entre aislados de Mtb por medio de la comparación de huellas genéticas ha permitido la obtención de información sobre la epidemiología de la enfermedad. La genotipificación aporta una visión sobre la reactivación, la transmisión reciente, así como sobre la frecuencia de reinfección exógena permitiendo evaluar la infectividad, transmisibilidad y otras diferencias fenotípicas entre aislados de Mtb (García-Pachón & Rodríguez, 2005). Las técnicas moleculares asociadas a análisis bioinformático permiten visualizar la presencia de clados revelando brotes en la comunidad, identificando factores de riesgo para la transmisión de ciertas cepas e incluso pueden revelar nuevas características biológicas.

La técnica molecular MIRU-VNTR consiste en la genotipificación basada en números variables de repeticiones en tándem (VNTRs) de diferentes clases de elementos genéticos intercalados llamados unidades repetitivas intercaladas micobacterianas (MIRUs) (Supply et al., 2006). En 1997, un estudio reveló inicialmente que 12 de los 41 loci MIRU presentes en el genoma de Mtb H37Rv corresponden a regiones VNTR tipo minisatélites del genoma humano (Supply, Magdalena, Himpens y Loch, 1997). Estos 12 loci contienen un número variable de copias de 51 a 77 pares de base (pb). Las variaciones en ellos virtualmente siempre consisten en la adición o delección secuencial de unidades de tamaños idénticos. Esto llevó a que sean utilizados para estudios de genotipificación y epidemiología de TB (Supply et al., 2000). Este método depende de la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de múltiples loci utilizando cebadores específicos para las regiones flanqueantes de cada locus repetido y en la determinación de los tamaños de los amplicones que reflejan el número de copias MIRU-VNTR en cada loci. Actualmente, la combinación de MIRU-VNTR con *spoligotyping* y algún otro método (SNPs o LDs) es actualmente el *gold standard* para la tipificación de aislados de Mtb a nivel global (Vasconcellos et al., 2014).

En este contexto se buscó en este trabajo genotipificar aislados de Mtb por el método MIRU-VNTR. Resulta interesante clasificar los aislados que circulan localmente ya que a futuro podrían ser analizados por metodologías más complejas como Secuenciación de Genoma Completo. Estudios que segregan a Mtb en clados son importantes porque el reconocimiento de sub-poblaciones o clones específicos con características genéticas o clínicas particulares podrían mejorar nuestro entendimiento acerca de las ventajas adaptativas de algunos linajes y de funciones de genes específicos en la patogenicidad, además de auxiliar en el desarrollo de nuevas estrategias para el combate a la TB. Es, por lo tanto, de gran importancia hacer un seguimiento de los genotipos de Mtb circulantes en Paraguay, donde la TB aún constituye un problema de salud pública.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar molecularmente aislados de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes con sospecha clínica de infección micobacteriana y con cultivos positivos remitidos al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IICS-UNA.

Objetivos Específicos

- Identificar por MIRU-VNTR patrones genéticos de los aislados de *M. tuberculosis*.
- Agrupar aislados de *M. tuberculosis* con características moleculares semejantes utilizando herramientas bioinformáticas.
- Establecer la frecuencia de genotipos y complementar con datos demográficos de los pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio piloto posee un diseño de tipo observacional, descriptivo, de corte transversal y cuenta con la aprobación de los comités del IICS con código M07/18.

Aislados y muestras de ADN

Se utilizó un total de 19 muestras a partir de un banco de ADN de Mtb disponible en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología. Se aplicó un muestreo no probabilístico, por conveniencia. Fueron seleccionados aislados remitidos al IICS de febrero a diciembre del 2008 provenientes del Hospital Km 81 ubicado en el departamento de Cordillera. Las muestras corresponden a cultivos tipificados como Mtb en el Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP) colocados en tubos tapa rosca con tampón Tris-EDTA 1X e inactivados por calor, conservados hasta la fecha a -20 °C. Fichas epidemiológicas de los pacientes fueron incluidas conteniendo datos demográficos como departamento, distrito, fecha de toma de muestra, sexo, edad. En el IICS se realizó la extracción y purificación del ADN utilizando el método CTAB (van Soolingen, de Haas, Hermans y van Embden, 1994). Las muestras excluidas componen aislados cuya cuantificación de ADN fue insuficiente y/o poseían ADN degradado.

Tipificación por MIRU-VNTR 12

La amplificación de los 12 loci MIRU-VNTR fue ejecutada utilizando 12 pares de cebadores según el método de Supply *et al.* (Supply *et al.*, 2000). Cada locus fue amplificado de manera individual a partir de 5 μ L de ADN en 45 μ L de mezcla de reacción de PCR conteniendo: Taq ADN polimerasa 1U, Buffer de PCR 1X, dNTPs 0,2 mM, par de

cebadores 0.2 μ M, $MgCl_2$ X mM (la concentración depende del locus desde 1,5 a 3 mM), betaína 1M, H_2O libre de nucleasas.

En algunos casos se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% (v/v) y/o betaína en la misma proporción como adyuvantes de la reacción de PCR. Se empleó un termociclador convencional Applied Biosystems 2720 (Thermo Fisher Scientific) con el programa esquematizado en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Programa del Termociclador. Se indican las condiciones de amplificación y el número de ciclos de cada etapa. Adaptación de Supply *et al.* (Supply *et al.*, 2000).

Etapas	Condiciones de Amplificación	Número de Repeticiones de cada ciclo
Desnaturalización inicial	95°C - 5 min	1X
Desnaturalización	94°C - 1 min	
Hibridación	59°C - 1 min	40X
Extensión	72°C- 1,5 min	
Extensión final	72°C- 10 min	1X

Para verificar la reacción de PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) (VWR Life Science) con buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X y condiciones de voltaje de 100-120 V por 40 min. Seguidamente, los productos de PCR fueron analizados en gel concentrador de poliacrilamida al 6,0% y gel separador al 10% (AppliChem) con buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X. La corrida fue estandarizada a 200 V constante (10 V/cm) por 2 a 4 h. Ambas corridas fueron visualizadas posterior tinción con bromuro de etidio 10 μ g/ml (Promega) bajo luz ultravioleta (UV). Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron determinados mediante su comparación con marcadores estándar de peso molecular de 50 y/o 100 pb (Thermo Fisher Scientific) mediante el programa bioinformático pyElph 1.3 (<http://sourceforge.net/projects/pyelph/files/releases/>) (Pavel y Vasile, 2012). El número de copias de cada locus fue asignado comparando el tamaño del producto de PCR con la tabla

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina 17, 18 y 19 de octubre de 2018
de número de copias alélicas *versus* tamaño del amplicón (pb) de Supply *et. al* (Supply *et al.*, 2000).

Se utilizó MIRU-VNTR_{plus} (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>) para la asignación del genotipo (Allix-Béguec, Harmsen, Weniger, Supply y Niemann, 2008). Los resultados se encuentran expresados en un código numérico que representa el número de copias alélicas de MIRU-VNTRs en cada uno de los 12 loci. En el caso de resultados

dudosos, el tamaño de los amplicones fue reconfirmado con un nuevo PAGE. En caso de ausencia de producto amplificado, se volvió a realizar la PCR correspondiente. La secuencia de pasos a seguir se esquematiza en la **Figura 1**.

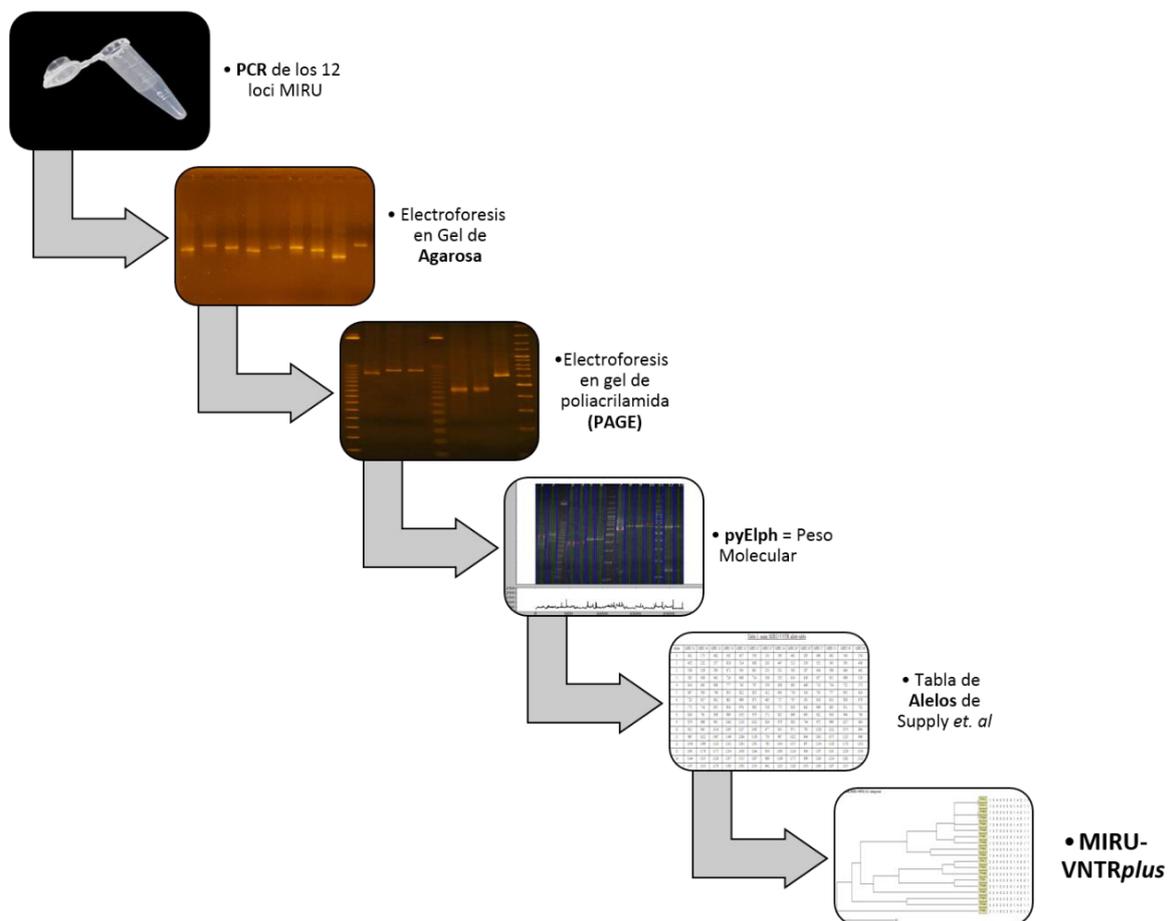


Figura 1. Flujograma de Trabajo para MIRU-VNTR. Se describen los pasos secuenciales a seguir para lograr la identificación del genotipo de un aislado Mtb.

Definición de familias y linajes basados en genotipo

La comparación de los genotipos mediante el análisis por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) se realizó para la caracterización de clados dentro de la población. Además, la comparación con bases de datos existentes se realizó para la búsqueda de probables familias y linajes aplicando un análisis de agrupamiento denominado Árbol Recubridor Mínimo (*Minimum Spanning Tree, MST*). Los parámetros para el agrupamiento se basaron en el índice categórico y variantes de un único locus o “*single-locus variant*” (SLV) que permite agrupar la mayor cantidad de genotipos

cuyos perfiles alélicos difieren en sólo un locus MIRU (Feil, Li, Aanensen, Hanage y Spratt, 2004). La diversidad alélica (h) en cada uno de los 12 loci y la tasa de agrupamiento fueron calculados por el programa MIRU-VNTR $plus$. El programa basa su cálculo en el Índice de Diversidad de Hunter Gaston (HGDI) (Hunter y Gaston, 1988). Se utilizó estadística descriptiva para presentar los resultados (Prism v5.0).

RESULTADOS

Se logró analizar 19 aislados que fueron obtenidos en un período de toma de muestra de febrero a diciembre del 2008. El 50% (9/18) de los pacientes son del sexo masculino. El rango de edad fue desde 18 hasta 67 años, con un promedio de 41 ± 15 años. El 68% (13/19) de las muestras provienen del departamento de Cordillera, de cinco diferentes municipios: Caacupé, Itacurubí, Tobatí, Piribebuy y Juan de Mena.

Identificación de patrones genéticos de los aislados de *Mycobacterium tuberculosis*

Los productos de PCR de cada locus MIRU fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa. Se observó que para los 12 loci MIRU hubo amplificación de todas las muestras. Una vez comprobado esto, dichos productos fueron analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida para una mejor separación y determinación del peso molecular.

Resultados de los 12 loci MIRU-VNTR

Con la realización de las corridas en geles PAGE de cada locus para las 19 muestras y su posterior revelado se pudo observar el nivel de polimorfismo que poseen las muestras de la población estudiada. También se distinguió el rango de peso molecular en el cual se encontraban las bandas de cada locus MIRU.

La **Figura 2A** y **B** representa a dos geles de poliacrilamida en donde se analizaron muestras de diversos MIRUs. Se detectaron los tamaños de bandas en pb de los productos amplificados para los 12 loci MIRU en las 19 muestras analizadas que se traducen en números de copias alélicas como se observa en la **Tabla 2**.

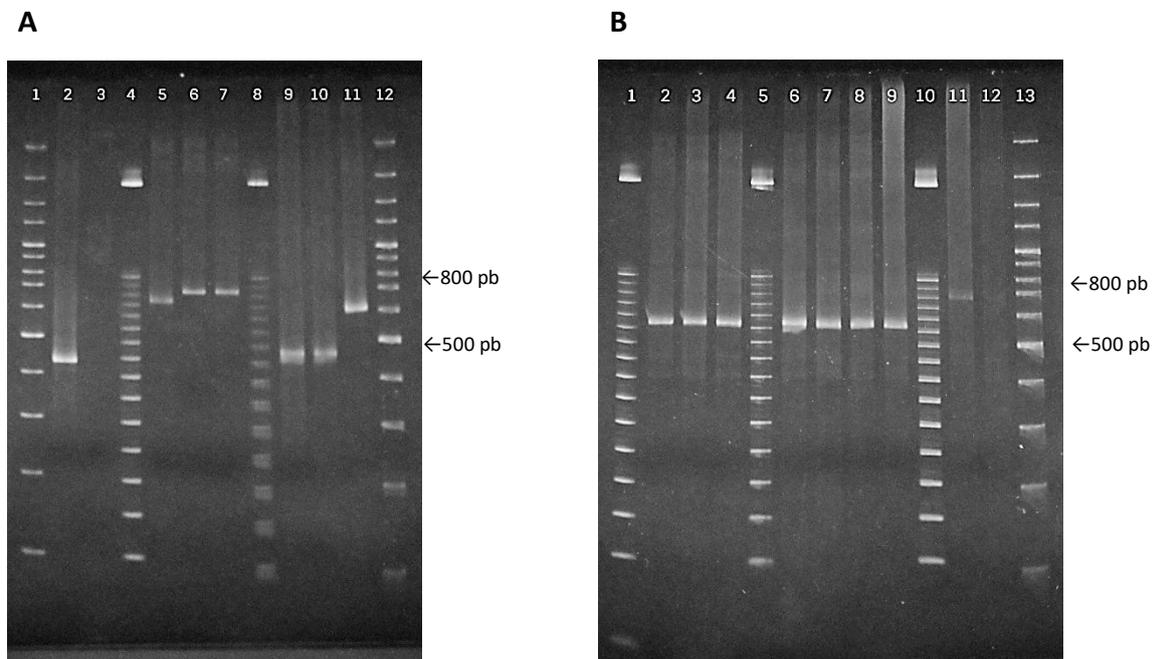


Figura 2. Gel de poliacrilamida al 10% de los productos de PCR de múltiples loci MIRU. A. Carriles 1 y 12: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 4 y 8: marcador de peso molecular de 50 pb. Carril 2: muestra PY450 de MIRU 02. Carril 3: muestra PY447 de MIRU 10. Carriles 5-7: muestras PY432, PY447, PY450 de MIRU 16. Carriles 9 y 10: muestras PY435 y PY450 de MIRU 26. Carril 11: muestra PY450 de MIRU 27 **B.** Carriles 1, 5 y 10: marcador de peso molecular de 50 pb. Carril 13: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2-4, 6-9: muestras PY412, PY413, PY414, PY429, PY433, PY448, PY449 de MIRU 20. Carriles 11 y 12: muestra PY440 de MIRU 40.

Tabla 2. Número de copias alélicas en cada locus MIRU-VNTR. Tabla resumida con número de copias alélicas correspondientes a los tamaños de banda obtenidos en las 19 muestras analizadas.

ID*	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40
PY412	1	2	3	3	2	6	1	4	2	1	1	4
PY413	2	2	4	3	2	5	1	4	3	2	1	3
PY414	1	2	3	3	2	6	1	4	2	1	1	4
PY428	2	3	2	4	2	5	1	4	2	1	1	4
PY429	1	2	3	3	2	6	1	4	2	1	1	5
PY430	1	2	3	3	2	6	1	4	2	1	1	5
PY431	2	2	2	3	2	6	1	4	2	2	1	4
PY432	2	1	0	2	2	6	1	4	2	2	1	1
PY433	2	2	4	3	2	5	1	4	2	2	1	3
PY435	1	2	3	3	2	6	1	4	2	1	1	6
PY436	1	2	3	3	2	6	1	3	1	1	1	4
PY437	1	2	2	3	2	6	1	4	2	1	1	6
PY438	1	2	3	3	2	7	1	3	2	1	1	4
PY439	2	2	2	3	2	6	1	4	2	2	1	1
PY440	1	2	3	3	2	6	1	4	2	1	1	7
PY447	2	2	8	3	2	5	1	5	2	3	1	4
PY448	3	3	2	3	2	5	1	4	2	1	1	2
PY449	2	2	3	3	2	5	1	4	2	2	1	3
PY450	1	2	2	3	2	6	1	4	2	1	1	5

*código de la muestra

Agrupación de aislados de *M. tuberculosis* con características moleculares semejantes por MIRU-VNTR_{plus}

Los patrones fueron clasificados por medio de la construcción de un árbol UPGMA que se denomina dendograma. En la **Figura 3** se observa el dendograma evidenciándose la presencia de un clado compuesto por las muestras PY412 y PY414, y otro clado compuesto por la muestra PY429 con la muestra PY430 con una similitud del 100%. Además, se lograron agrupar 4 clados con 12 de las 19 muestras analizadas arrojando una similitud de 80%. El software reordena el código del número de copias alélicas en los 12 loci en un orden de acuerdo a la posición del locus dentro del genoma de *Mtb*.

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [12]: Categorical

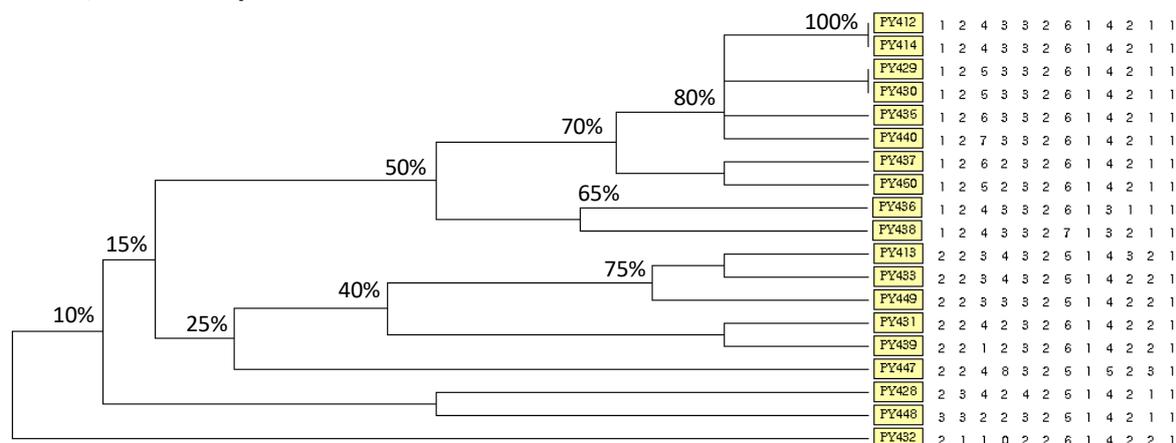


Figura 3. Dendograma de los resultados de MIRU-VNTR para los 19 aislados *Mtb*. La agrupación por clados fue realizada por UPGMA con peso igual para cada uno de los 12 loci (MIRU-VNTR_{plus}). Se observa de izquierda a derecha: el dendograma, el código de identificación del aislado y el código del perfil de loci MIRU-VNTR 12. Los porcentajes de similitud se encuentran indicados al inicio de cada ramificación.

La **Tabla 3** demuestra la tasa de agrupamiento de 0,105 que indica la existencia de 4 aislados en 2 clados (100% de similitud) en la población estudiada. En base al HGDI, Sola *et al.* (Sola *et al.*, 2003) clasifica a un determinado locus MIRU en altamente discriminatorio

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina 17, 18 y 19 de octubre de 2018
($h > 0,6$), moderadamente discriminatorio ($0,3 \leq h \leq 0,6$) y menos discriminatorio ($h < 0,3$). Se determinó que los loci MIRU 10 y 40 fueron altamente discriminatorios, los loci MIRU 02, 23 y 31 fueron moderadamente discriminatorios y los loci MIRU 04, 16, 20, 24, 26, 27 y 39 fueron poco discriminatorios para la población analizada.

Tabla 3. Tasa de agrupamiento y HGDI. Se indica la tasa de agrupamiento del análisis completo de MIRU-VNTR así como el HGDI de cada locus MIRU resultante del análisis de las 19 muestras.

Tasa de agrupamiento MIRU-VNTR: 0,10526316

Índice de diversidad alélica Hunter-Gaston (HGDI)

MIRU 02: 0,52	●	MIRU 16: 0,15	●	MIRU 24: -0,06	●	MIRU 31: 0,47	●
MIRU 04: 0,24	●	MIRU 20: -0,06	●	MIRU 26: 0,24	●	MIRU 39: -0,06	●
MIRU 10: 0,64	●	MIRU 23: 0,47	●	MIRU 27: 0,15	●	MIRU 40: 0,77	●

- Altamente discriminatorio
- Moderadamente discriminatorio
- Menos discriminatorio

Se observa en la **Figura 4** el árbol MST construido con los resultados de MIRU-VNTR de los 19 aislados en círculos rojos comparados con los círculos de color amarillo que representan cepas circulantes en el Paraguay durante los años 2001 al 2008. Estos últimos cuentan con resultados de *spoligotyping*. Se observa que 15 aislados (79%) se agrupan esencialmente con miembros de la familia Latin-American & Mediterranean (LAM), mientras que un aislado (5%) pertenecería a la familia Haarlem (H) y 3 aislados (16%) se agruparon con la familia X.

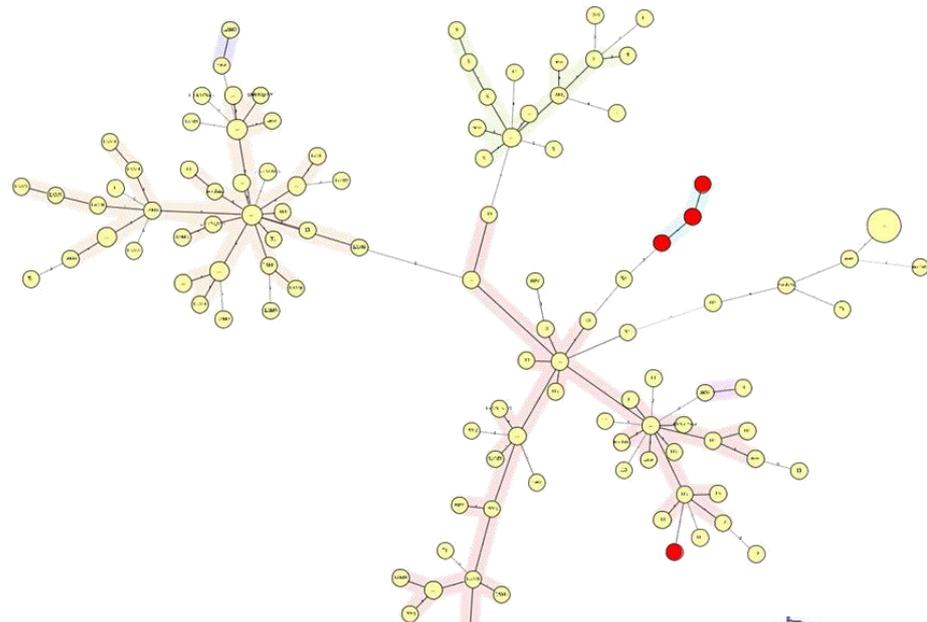


Figura 4. MST construido en base a resultados de MIRU-VNTR de los aislados de la población estudiada y aislados previamente tipificados del Paraguay. En rojo los aislados de la población estudiada en este trabajo, en amarillo cepas circulantes en el Paraguay durante los años 2001 al 2008. Cada círculo representa un perfil de MIRU-VNTR y el tamaño del círculo es relativo al número de aislados con dicho perfil. Las líneas sólidas y más gruesas indican diferencia de un único locus, las líneas más finas diferencia de 2 loci, las líneas entrecortadas gruesas representan diferencia de 3 loci y las líneas entrecortadas finas diferencia de 4 loci (MIRU-VNTR $plus$).

DISCUSIÓN

Los métodos moleculares han sido utilizados para estudios epidemiológicos de TB principalmente en países desarrollados. Sin embargo, desde hace unas décadas en Sudamérica (Balcells et al., 2015; Machado et al., 2014; Taype et al., 2012; Vasconcellos et al., 2014) y en Paraguay (Candia et al., 2007) se han hecho esfuerzos para evaluar la diversidad genética de Mtb empleando diversas herramientas moleculares.

En este estudio el uso de MIRU-VNTR (12 loci) permitió agrupar los aislados PY412 y PY414 en un mismo clado con un 100% de similitud, sin embargo, no se encontró asociación geográfica directa ya que los pacientes provienen de los distritos Caacupé y Minga Guazú. Para confirmar la clonalidad de estos genotipos, ameritaría aumentar el estudio a MIRU-VNTR 24 loci con el fin de conseguir un mayor poder resolutivo (Conceição et al., 2017). Si con MIRU 24 loci aún se mantiene la formación del clado, entonces ameritaría realizar una investigación epidemiológica *in situ* sobre la posible transmisión entre estos pacientes. Por otro lado, ya que los aislados corresponden a la misma fecha de toma de muestra, también existe una posibilidad de “*cross-contamination*” o contaminación cruzada en el laboratorio. Detectamos además otro clado con 100% de similitud que contiene a las muestras PY429 y PY430. Ambas muestras provienen del departamento de

Cordillera, de los distritos Piribebuy y Caacupé, respectivamente. Las localidades son cercanas y los aislados se obtuvieron también en la misma fecha, por lo tanto, corresponde hacer una investigación epidemiológica más profunda para detectar un posible “*link*” epidemiológico. El hecho de que se hayan encontrado 4 clados con 80% de similitud podría significar que las cepas circulantes se están transmitiendo en la región y que existen mutaciones mínimas en los loci estudiados. Este grado de agrupación también amerita investigación epidemiológica operacional.

Otro aspecto que ha sido explorado fue la diversidad alélica (h) para cada minisatélite. En referencia a esto, MIRU 10 y MIRU 40 en esta población aparecen como alelos que permiten distinguir inmediatamente si un aislado se trata de un clon o no. Esto es, tienen el poder de discriminar entre aislados. Análisis del polimorfismo alélico de los 12 loci MIRU-VNTR por medio del HGDI en estudios realizados en la región de Sudamérica revelaron tendencias similares (Cerezo et al., 2012; Noguti et al., 2010; Taype et al., 2012). Realizar este tipo de análisis es importante ya que el poder discriminatorio de cada loci

depende de los linajes endémicos en cada región o país y la utilidad de realizar inicialmente el análisis con los 12 loci MIRU radica en que estos actúen como un filtro o indicador para evitar la diseminación de un brote en cierta región del país llevando a cabo una búsqueda en el terreno de posibles conexiones epidemiológicas.

Un estudio publicado por Candia *et al.* (Candia et al., 2007) clasificó a cepas recolectadas en el Paraguay durante 2001-2002 en patrones por medio de *spoligotyping*. Este estudio reveló la frecuencia de distribución de linajes circulantes demostrando que el genotipo LAM fue ubicuo y predominante sugiriendo una transmisión constante y una evolución adaptativa en el Paraguay. Con el árbol MST se evidenció una agrupación de la mayoría de los aislados estudiados con cepas previamente tipificadas como LAM sugiriendo que pertenecerían en su mayoría a dicha familia. En la literatura publicada proveniente de otros países sudamericanos, generalmente la familia LAM se encuentra como prevaleciente (Abadía et al., 2009; Balcells et al., 2015; Cerezo et al., 2012; Taype et al., 2012).

Este estudio resalta la importancia de la búsqueda de una combinación personalizada de loci por región o país que puede abaratar costos en países en vía de desarrollo donde determinadas familias son altamente prevalentes y endémicas. Por otro

lado, es importante recordar que cuando se combina MIRU-VNTR con otras técnicas moleculares como *spoligotyping*, detección de SNPs o incluso ampliando la cantidad de loci MIRU analizados, se logra un mejor entendimiento de la estructura de la población bacteriana y consecuentemente un mejor entendimiento de las relaciones entre cepas de Mtb y su relación con el huésped en regiones con una incidencia importante de TB.

CONCLUSIONES

La técnica molecular MIRU-VNTR logró identificar los patrones genéticos de 19 aislados de Mtb. El análisis bioinformático permitió la agrupación de los aislados en base a los genotipos representados por el código numérico de los 12 loci logrando la identificación de clados con 100% y 80% de similitud. Se encontraron 2 clados con 100% de similitud lo que implicaría que pertenecen al mismo genotipo. Teniendo en cuenta la geolocalización y el periodo de toma de muestra, aunque los pacientes provengan de municipios diferentes, estimamos que debe existir alguna relación epidemiológica entre ellos. El hecho de que se hayan encontrado 12 de 19 muestras en 4 clados con 80% de similitud podría significar que las cepas circulantes se están transmitiendo en la población estudiada y que existen mutaciones mínimas en los loci estudiados. Los loci MIRU 10 y MIRU 40 presentaron el mayor poder discriminatorio entre los aislados con un HGDI ($h > 0,6$). Fue factible detectar las familias LAM, Haarlem y X con predominio de la familia LAM (79%). A pesar del escaso número de muestras analizadas, el resultado condice con reportes anteriores para el país y la región.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadía, E., Sequera, M., Ortega, D., Méndez, M. V., Escalona, A., Da Mata, O., Takiff, H. E. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: Epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. *BMC Infectious Diseases*, 9, 122. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-122>
- Allix-Béguec, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P. y Niemann, S. (2008). Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2692–2699. <https://doi.org/10.1128/JCM.00540-08>
- Balcells, M. E., García, P., Meza, P., Peña, C., Cifuentes, M., Couvin, D. y Rastogi, N. (2015). A First Insight on the Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Complex as Studied by Spoligotyping and MIRU-VNTRs in Santiago, Chile. *PLOS ONE*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118007>
- Candia, N., Lopez, B., Zozio, T., Carrivale, M., Diaz, C., Russomando, G., Ritacco, V. (2007). First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. *BMC Microbiology*, 7, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-75>
- Cerezo, I., Jiménez, Y., Hernandez, J., Zozio, T., Murcia, M. I. y Rastogi, N. (2012). A first

insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(4), 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.006>

Conceição, E. C., Rastogi, N., Couvin, D., Lopes, M. L., Furlaneto, I. P., Gomes, H. M., Batista Lima, K. V. (2017). Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Pará, Brazil, reveals a higher frequency of ancestral strains than previously reported in South America. *Infection, Genetics and Evolution*, 56(10), 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.021>

Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. y Spratt, B. G. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1518–1530. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004>

García-Pachón, E., Rodríguez, J. C. (2005). Epidemiología molecular de la tuberculosis: principales hallazgos y su aplicación en España. *Archivos de Bronconeumología*, 41(11), 618–624. <https://doi.org/10.1157/13081251>

Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2465–2466.

Machado, L. N. C., Marcondes, N. R., Fijimura Leite, C. Q., Barreto Santos, A. C., Pavan, F. R., Baldin, V. P., Cardoso, R. F. (2014). First baseline of circulating genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis* in patients from the Brazilian borders with Argentina and Paraguay. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107106>

Noguti, E. N., Leite, C. Q. F., Malaspina, A. C., Santos, A. C. B., Hirata, R. D. C., Hirata, M. H., Cardoso, R. F. (2010). Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Paraná in Southern Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(6), 779–785. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000600008>

Pavel, A. B., & Vasile, C. I. (2012). PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>

- Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Lesjean, S., Locht, C., Supply, P., & Rastogi, N. (2003). Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: Association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(2), 125–133. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(03\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(03)00011-X)
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsç-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. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-06>
- Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S. y Locht, C. (1997). Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular Microbiology*, 26(5), 991–1003.
- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B. y Locht, C. (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology*, 36(3), 762–771. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x>
- Taype, C. A., Agapito, J. C., Accinelli, R. A., Espinoza, J. R., Godreuil, S., Goodman, S. J., Shaw, M. A. (2012). Genetic diversity, population structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(3), 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.002>
- van Soolingen, D., de Haas, P. E., Hermans, P. W. y van Embden, J. D. (1994). DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods in Enzymology*, 235, 196–205.
- Vasconcellos, S. E. G., Acosta, C. C., Gomes, L. L., Conceição, E. C., Lima, K. V., De Araujo, M. I., Suffys, P. N. (2014). Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Brazil based on genotypes obtained by spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive unit typing and the presence of large sequence and single nucleotide polymorphism. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107747>
- WHO. (2017). Global Tuberculosis Report 2017. *Who*. <https://doi.org/WHO/HTM/TB/2017.23>

