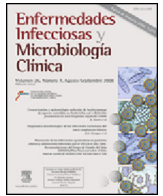




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Propuesta de un panel MIRU-VNTR 5 para el tamizaje de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* en México



Enrique Bolado-Martínez^{a,*}, Maria del Carmen Candia-Plata^b, Roberto Zenteno-Cuevas^c, Fabiola Mendoza Damián^d, Magali Avilés-Acosta^e y Gerardo Álvarez-Hernández^b

^a Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México

^b Departamento de Medicina, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México

^c Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

^d Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de México, Toluca, México

^e Laboratorio Estatal de Salud Pública, Hermosillo, Sonora, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 16 de mayo de 2014

Aceptado el 17 de octubre de 2014

On-line el 11 de diciembre de 2014

Palabras clave:

Mycobacterium tuberculosis

MIRU-VNTR

México

R E S U M E N

Introducción: La tuberculosis es un problema de salud pública que se distribuye de forma diferenciada en regiones de México. El presente trabajo propone un panel, con el mínimo número de MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeats), para la diferenciación preliminar de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*).

Método: Se realizó el panel completo de 24 MIRU-VNTR a 65 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de diferentes regiones geográficas de México.

Resultados: Se presenta un panel de cinco loci MIRU-VNTR para discriminar aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de tres diferentes regiones geográficas de México.

Conclusiones: La utilización del panel MIRU-VNTR 5 podría utilizarse como tamizaje durante la caracterización genotípica de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* en México.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Proposal of a five MIRU-VNTR panel to screen clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico

A B S T R A C T

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis

MIRU-VNTR

Mexico

Introduction: Tuberculosis is a public health problem across Mexico. This paper aims to select a panel, with a minimum number of repetitive elements (MIRU-VNTR) for genotypic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) clinical isolates.

Method: In this study, a full panel of 24 MIRU-VNTR loci was used to discriminate 65 clinical isolates of *M. tuberculosis* from three different geographical regions of Mexico. Those loci with the highest discriminatory power were subsequently selected.

Results: The panel, including five loci, was obtained by selecting the highest values of allelic diversity among the genotypes obtained. The dendrogram, generated by the panel MIRU-VNTR 5, showed a high discriminatory power with 65 unique genotype profiles and formed clusters according to the geographical region of origin.

Conclusions: The panel MIRU-VNTR 5 can be useful for characterizing clinical isolates of *M. tuberculosis* in Mexico.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ebolado@guayacan.uson.mx (E. Bolado-Martínez).

Introducción

La tuberculosis (TB) es un problema de salud pública en México. La intensa migración poblacional entre distintas regiones de México podría favorecer la diseminación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). No obstante lo anterior, las diferentes regiones presentan distintos patrones de incidencia de TB. Por ejemplo, en el año 2010 Sonora, ubicada en la región noroeste del país y en colindancia con los Estados Unidos de Norteamérica, ocupó el 4.º lugar en incidencia de TB (31,2/100.000); por otro lado Veracruz, en el sudeste del país (aproximadamente a 2.500 km de Sonora), ocupó la séptima posición con una incidencia de 26,7/100.000. Finalmente, el Estado de México, ubicado en el centro del país (a 2.000 km de Sonora y 450 km de Veracruz) se ubicó en el penúltimo lugar de incidencia de TB (5,1/100.000)¹. Debe realizarse un esfuerzo importante en México para conocer mejor la distribución y los patrones de diseminación geográfica de las cepas de *M. tuberculosis*. Para lograr esto, es necesario simplificar los métodos moleculares para incrementar su uso sistemático.

El análisis de 24 *loci* MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeats) es un método de alta resolución para la genotipificación rápida de aislamientos de *M. tuberculosis*, no obstante, algunos estudios han mostrado que las combinaciones con un número menor de *loci* presentan un menor poder discriminatorio que el panel estándar de 24 *loci*², sin embargo los formatos con pocos elementos MIRU-VNTR podrían ser de gran utilidad para el tamizaje de los aislamientos clínicos³. En este estudio se presenta un panel de cinco *loci* MIRU-VNTR seleccionados por su poder para discriminar adecuadamente una muestra poblacional de aislamientos de *M. tuberculosis* procedentes de tres diferentes regiones de México. El uso de este panel MIRU-VNTR para el tamizaje de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, brindaría la posibilidad de optimizar recursos y estudiar con más precisión aspectos epidemiológicos de la TB en México.

Método

Se utilizaron 65 aislamientos de *M. tuberculosis*, sin caracterización genotípica previa, recuperados entre 2006 y 2010 de residentes de tres diferentes regiones geográficas: Estado de México (n=20), Sonora (n=27) y Veracruz (n=18). Todos los aislamientos fueron identificados por métodos fenotípicos (pruebas bioquímicas convencionales) y genotípicos (*gyrB*-RFLP y RD12)⁴⁻⁶.

En Sonora, el ADN genómico de los aislamientos se obtuvo como se describió previamente⁷. En los aislamientos provenientes del Estado de México y Veracruz, el ADN se obtuvo mediante un procedimiento que involucra la utilización del detergente CTAB⁸.

Para la genotipificación, se amplificaron los 24 *loci* MIRU-VNTR en reacciones de PCR individuales, utilizando los iniciadores y las condiciones descritos en estudios previos^{2,9}. Posteriormente el tamaño de las bandas se determinó mediante el programa TotalLab TL100 (Nonlinear Dynamics, Ltd., United Kingdom). Los dendrogramas fueron generados por el método UPGMA y el coeficiente de correlación de Pearson en el programa Bionumerics versión 6.5 (Applied Maths, Belgium). La diversidad alélica (*h*) de cada *locus* fue calculada como se ha descrito previamente¹⁰; a partir de los resultados se seleccionaron los *loci* con mayor diversidad alélica para formar un panel de 5 *loci* MIRU-VNTR y así generar un nuevo dendrograma.

De los 24 elementos repetitivos analizados, se utilizaron los resultados de 12 *loci* MIRU para generar los códigos MIT y cinco VNTR, para obtener los respectivos códigos VIT, los mismos que fueron capturados en la base de datos SITVIT¹¹.

Resultados

Al realizar el análisis genotípico de los 65 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* incluidos en este estudio, se observaron 65 genotipos, uno específico por cada aislamiento. Los *loci* que presentaron mayor diversidad alélica entre los 65 aislamientos, fueron QUB 26 (0,85), Mtub 04 (0,79), QUB 11b, MIRU 26 y MIRU 40 (tabla 1) y por esta razón fueron seleccionados para formar el panel MIRU-VNTR 5. Con este panel acortado, los 65 genotipos identificados con el panel MIRU-VNTR 24, formaron 9 grandes grupos relacionados casi exclusivamente, de acuerdo a cada una de las tres regiones geográficas de México estudiadas (fig. 1).

La búsqueda de los patrones 24-*loci* MIRU-VNTR en la base de datos SITVIT no arrojó resultados favorables, ya que no fue posible identificar similitudes ni asignar códigos MIT para 64 de los aislamientos clínicos (fig. 1). Solamente el aislamiento C-102 pudo asignarse al clado X2. Al introducir el código VIT, se obtuvieron códigos para 27 de los aislamientos (fig. 1), tres aislamientos fueron clasificados como huérfanos y el resto no pudo ser clasificado, al no encontrarse cepas registradas que compartieran los códigos obtenidos para estos aislamientos clínicos.

Tabla 1

*Loc*i MIRU-VNTR que presentaron mayor diversidad alélica en 65 aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de México

MIRU locus	Variabilidad alélica												Diversidad alélica
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>Estado de México</i>													
QUB26			1	1	3	4	3	2	4	2			0,85
Mtub 4		3	4	7	2	2	1	1					0,79
QUB 11b			2	3	8	3	3		1				0,76
MIRU 40			5	7	3	3	2						0,76
MIRU 26			1	1	4	9	5						0,69
<i>Veracruz</i>													
QUB 26	3	3			3		3	3	2	1			0,84
Mtub 4		2	2	5	2	4	2	1					0,82
MIRU 26				1	2	3	3	4	4	1			0,82
QUB 11b		4	4	5	3	1		1					0,79
MIRU 40		1	2	8	3	1	2	1					0,74
<i>Sonora</i>													
QUB 26			1		4	5	2	5	8	1	1	1	0,82
Mtub 4		5	7	6	4	1	2	3					0,82
MIRU 40		6	4	7	7	3	1						0,79
MIRU 26		1	1	7	5	9	5						0,76
QUB 11b		1	2	5	11	5	3		1				0,76

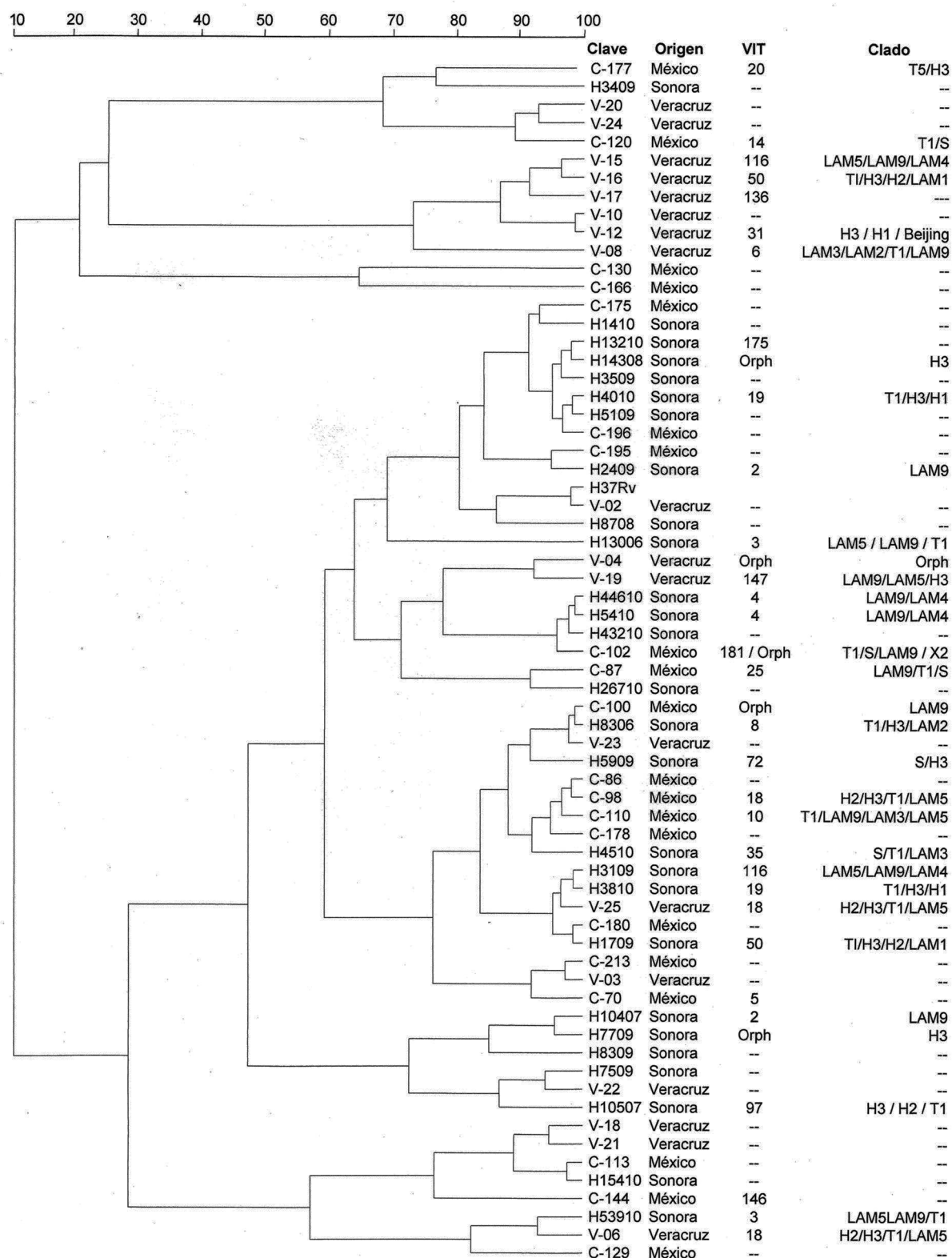


Figura 1. Dendrograma generado, utilizando MIRU-VNTR 5, para la cepa H37Rv y 65 aislamientos clínicos, provenientes del Estado de México, Sonora y Veracruz.

Discusión

La genotipificación mediante MIRU-VNTR es útil para identificar perfiles genotípicos microbianos pertenecientes a una misma región geográfica¹². Por esta razón, en diversas regiones

del mundo se realizan investigaciones para identificar los *loci* MIRU-VNTR con mayor poder de discriminación³. En este estudio, se encontró que el desempeño de un panel MIRU-VNTR con cinco *loci*, fue comparable al panel estándar MIRU-VNTR 24 en la discriminación de 65 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*

provenientes de los estados mexicanos de Sonora, Estado de México y Veracruz.

Un estudio reciente realizado en México con el panel 12 loci MIRU-VNTR también demostró gran variabilidad alélica en 109 aislamientos clínicos obtenidos de 23 estados de México¹³.

Respecto a los loci con mayor poder discriminatorio (tabla 1) elegidos para formar el panel MIRU-VNTR 5, reportes provenientes de países latinoamericanos demostraron que dos de estos loci, MIRU 26 y MIRU 40, son de los más polimórficos y tienen un elevado poder de discriminación^{14,15}. En regiones geográficamente muy distantes de Latinoamérica, como Eurasia, el locus MIRU26 también tuvo un poder de discriminación alto en cepas de MTB aisladas en Rusia¹⁶.

No se detectó la presencia de aislados idénticos (100% de similitud); esto podría deberse a la probablemente alta variabilidad alélica de las cepas de *M. tuberculosis* presentes en México. No obstante, el panel con cinco loci MIRU-VNTR propuesto en el presente trabajo (QUB 26, Mtub 04, QUB 11b, MIRU 26 y MIRU 40) tiene un buen poder de discriminación para los aislamientos clínicos de MTB de las tres regiones geográficas de México estudiadas (estado de México, Sonora y Veracruz), por lo que su empleo ayudaría a diferenciar presuntivamente el origen de las cepas de MTB de estas tres regiones geográficas y posiblemente de otras áreas del país.

Si bien, análisis posteriores con un número más grande de aislamientos permitirán fortalecer el valor de los hallazgos presentados en este trabajo, estos resultados permiten mostrar la utilidad del panel propuesto como un panel tamiz, no para sustituir MIRU 24, sino para utilizarlo en análisis preliminares de los aislamientos micobacterianos.

Financiación

Este trabajo fue apoyado por «Apoyo a la Incorporación de Nuevos PTC», convocatoria 2010 y «Fortalecimiento de los Cuerpos Académicos», convocatoria 2011, del Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) de México.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer la invaluable participación de la M. en C. Ansix Pérez-Mendoza, Q. B. C. María Georgina Ortiz-Arballo y la Q. B. C. Esmeralda Guadalupe Urías-Cázares en la caracterización genotípica de los aislamientos.

Bibliografía

1. Secretaría de Salud. Perfil epidemiológico de la tuberculosis en México. México D.F.: 2012. SINAVE/DGE/SALUD [consultado mayo 2014]. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/Monografias5.Tuberculosis_Mex_junio12.pdf
2. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:4498–510.
3. Liu RX, Li QZ, Xing LL, Peng Z, Zhu CM, Yang ZH. Genotyping of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates based on eight loci of MIRU-VNTR. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013;17:243–5.
4. Chimara E, Ferrazoli L, Leão SC. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:745–8.
5. Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1637–50.
6. Niemann S, Harmsen D, Rüsch-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 2000;38:3231–4.
7. Bolado-Martínez E, Pérez-Mendoza A, Alegría-Morquero FM, Candia-Plata MC, Aguayo-Verdugo MR, Álvarez-Hernández G. Mutaciones asociadas con resistencia a rifampicina o isoniazida en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de Sonora, México. *Salud Publica Mex*. 2012;54:167–70.
8. Somerville W, Thibert L, Schwartzman K, Behr MA. Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a question of containment. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2996–7.
9. Kam KM, Yip CW, Tse LW, Wong KL, Lam TK, Kremer K, et al. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates of the Beijing family. *J Clin Microbiol*. 2005;43:306–13.
10. Sun YJ, Bellamy R, Lee AS, Ng ST, Ravndran S, Wong SY, et al. Use of Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1986–93.
11. Demay C, Liens B, Burguiere T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB—a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2012;12:755–66.
12. Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Sánchez ML, Herranz M, Peñafiel T, Bonillo M, et al. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2026–32.
13. Martínez-Guarneros A, Rastogi N, Couvin D, Escobar-Gutierrez A, Rossi LM, Vazquez-Chacon CA, et al. Genetic diversity among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Mexico. *Infect Genet Evol*. 2013;14:434–43.
14. Cerezo I, Jiménez Y, Hernandez J, Zozio T, Murcia MI, Rastogi N. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. *Infect Genet Evol*. 2012;12:657–63.
15. Noguti EN, Leite CQ, Malaspina AC, Santos AC, Hirata RD, Mamizuka EM, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Paraná in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105:779–85.
16. Afanas'ev MV, Ikryanikova LN, Il'ina EN, Kuz'min AV, Larionova EE, Smirnova TG, et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* circulated in Moscow, Russian Federation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:181–91.