

Evaluación del poder discriminatorio de técnicas de epidemiología molecular en aislados Venezolanos de *Mycobacterium tuberculosis*.

María Victoria Méndez¹, Cristy León², Arnelly Escalona², Edgar Abadia², Omaira Da Mata³, Jacobus de Waard³ y Howard Eugene Takiff².

¹Universidad de Carabobo-Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

²Laboratorio de Genética Molecular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela.

³Instituto de Biomedicina-Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Palabras clave: tuberculosis; epidemiología molecular; MIRU-VNTR; espoligotipaje.

Resumen. La técnica de espoligotipaje y el método de unidades repetitivas micobacterianas interdiseminadas y número variable de repetidos tándem (MIRU-VNTR) 24 loci se emplean para estudiar la epidemiología molecular de tuberculosis. En el presente trabajo evaluamos la discriminación del método MIRU-VNTR 24 loci solo y en asociación con espoligotipaje en aislados clínicos de *M. tuberculosis* en Venezuela, la diversidad alélica de los 24 loci, y el poder discriminatorio para la combinación de 24 y 15 loci, 12 loci tradicionales (12t), aquellos con más alta diversidad alélica y una nueva combinación que denominamos 12 inv. Se estudiaron 104 cepas de diferentes linajes y 431 cepas de la familia Latin-America y Mediterráneos (LAM). Los loci 4052, 2163b, 424 y 2996 presentaron la más alta diversidad alélica. Las tasas de agrupamiento de MIRU-VNTR 24 loci, espoligotipaje y MIRU-VNTR combinado con espoligotipaje para 104 aislados fueron de 18,27%, 71,15% y 14,4%, respectivamente, mientras que para cepas LAM fue de 43,2%, 95,8% y 37,4%. Las combinaciones de 15, 12inv y 4 loci MIRU-VNTR más discriminatorios, fueron más discriminatorios que 12t. Las tasas de agrupamiento para 15 y 12inv MIRU VNTR acoplados a espoligotipaje en los 104 aislados fueron de 21% y 23%, mientras que para cepas LAM fue de 52% y 46% respectivamente. El número de patrones diferentes fue similar para 12inv y 15 loci. Se propone el uso de un número reducido de loci MIRU-VNTR informativos acoplado a espoligotipaje para estudios de la transmisión de la tuberculosis en Venezuela.

Evaluation of discriminatory power of molecular epidemiology techniques in *Mycobacterium tuberculosis* Venezuelan isolates.

Invest Clin 2016; 57(1): 25-37

Keywords: tuberculosis; molecular epidemiology; MIRU-VNTR typing; spoligotyping.

Abstract. The techniques of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit and variable-number tandem repeat typing with 24 loci (MIRU-VNTR-24), have been used to study the molecular epidemiology of tuberculosis. The aim of this study was: to evaluate the discriminative power of MIRU-VNTR 24 loci alone and in association with spoligotyping in clinical isolates of *M. tuberculosis* in Venezuela; the allelic diversity of the 24 loci; and the discriminative power for the combination of 24 and 15 loci, 12 traditional loci (12t), those with higher allelic diversity and a new combination named 12inv. We analyzed one set of 104 strains of different lineages and a second set of 431 strains belonging to the Latin-America and Mediterranean lineage (LAM) that is predominant in Venezuela. The determination of allelic diversity showed that 4052, 2163b, 424 y 2996 are highly discriminative. Clustering rates of MIRU-VNTR 24 loci, spoligotyping and MIRU-VNTR combined with spoligotyping for 104 isolates were 18.27%, 71.15% and 14.4%, respectively, whereas with the 431 LAM strains the values were 43.2 %, 95.8% and 37.4%. MIRU-VNTR combinations of 15, 12inv and 4 loci were more discriminatory than 12t. Clustering rates for MIRU-VNTR 15 and 12inv loci coupled with spoligotyping in the 104 isolated was 21% and 23%, while for LAM strains was 52% and 46% respectively. The number of different genetics patterns for 15 and 12inv loci were similar. In conclusion, we propose the use of a small number of informative loci MIRU-VNTR coupled to spoligotyping to investigate the transmission of tuberculosis in Venezuela.

Recibido: 24-11-2014. Aceptado: 12-11-2015

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que cada año se producen 9 millones de casos y mueren 1,7 millones de personas (1,2). La incidencia de TB en Venezuela es moderada, con aproximadamente 33 casos por cada 100.000 habitantes por año (1,2).

El entendimiento de la dinámica de la transmisión de la TB se ha logrado gracias a la aplicación de diferentes técnicas de epidemiología molecular (EM). Entre las técnicas más utilizadas, se encuentra aquella basada en el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, conocida como RFLP IS6110. El método fue considerado

el estándar de oro por su alta capacidad de discriminación, a pesar de tener como desventajas el ser laborioso, no generar formatos digitales que faciliten la interpretación de los resultados y las comparaciones intra e interlaboratorios, además de requerir de mucho ADN de excelente calidad (3, 4).

En los últimos años, dos métodos alternativos basados en PCR han sido utilizados: el espiligotipaje y el análisis de Unidades Repetitivas Micobacterianas Interdiseminadas basado en el Número Variable Repetidos Tandem conocida como MIRU- VNTR. La técnica de espiligotipaje se fundamenta en la amplificación por PCR del locus de repetidos directos (DR) (4,5) que pertenece a la familia de repetidos cortos palindrómicos interdiseminados regularmente

(CRISPR) (6). La técnica ha sido útil ya que el polimorfismo presente en la región DR ha permitido la asociación de linajes con regiones geográficas a nivel mundial. Sin embargo, su principal desventaja radica en que es poco discriminatoria, por lo que no es útil para detectar brotes ni cadenas de transmisión (7).

El método MIRU-VNTR está basado en la amplificación por PCR de múltiples loci con secuencias repetidas que están presentes en el genoma de *M. tuberculosis*, y permite determinar el número de repetidos en cada locus. Inicialmente, se empleó un sistema denominado "tradicional", que utilizaba 12 loci para estudios epidemiológicos (8), pero su discriminación no era comparable con el método RFLP IS6110 (7). Finalmente, se propuso un formato estandarizado de 24 loci con una discriminación comparable al método RFLP IS6110 y superior a espoligotipaje y un subgrupo de 15 loci para estudios epidemiológicos (9, 10). Por su capacidad discriminatoria, MIRU-VNTR 24 loci es actualmente considerado el método estándar de oro para la tipificación genética de *M. tuberculosis* (11).

Adicionalmente, en diferentes estudios se ha demostrado una variabilidad en el nivel del polimorfismo de los loci MIRU-VNTR que puede atribuirse al origen geográfico de la cepa y a diferencias entre los linajes genéticos (9, 6). Por otra parte, basados en la diversidad alélica de los diferentes loci MIRU-VNTR, existen evidencias previas que sugieren, que el número y la combinación de loci MIRU-VNTR a utilizar para discriminar entre los genotipos, puede adaptarse a la población de cepas *M. tuberculosis* encontradas en el área en estudio (13, 14).

En Venezuela, un estudio previo en una población amerindia de alta incidencia de TB conocida como Waraos, constató que el 78% de los aislados de *M. tuberculosis* presentaban similitud genética, por lo que se encontraban agrupados en clusters, pero además demostró que MIRU-VNTR 15 loci combinado con espoligotipaje, así como MIRU-VNTR 24 loci, tienen la suficiente discriminación para reemplazar el método RFLP IS6110 (15). Otra investigación previa a gran escala

en Venezuela, en el que se aplicó espoligotipaje, demostró que los linajes más predominantes fueron Latin América-Mediterráneos (LAM) en 53%, seguido del genotipo T (10,6%) y Haarlem (5%). Los cinco espoligotipos más frecuentes fueron los tipo compartidos o SIT 17 (18,6%), 93 (9,9%), 605 (7,2%), 42 (6,5%) y 53 (4,1%) (16).

Aunque estudios previos han sugerido que MIRU-VNTR 24 loci posee mejor discriminación que el método de espoligotipaje, fue en el presente estudio que por primera vez se aplicaba la técnica a gran escala con los diferentes genotipos encontrados en Venezuela por la técnica de espoligotipaje. Es por lo antes expuesto, que el objetivo de la investigación fue evaluar la discriminación del método MIRU-VNTR 24 loci solo y en asociación con espoligotipaje en aislados clínicos de *M. tuberculosis* en Venezuela. Además, nos propusimos determinar la diversidad alélica de los 24 loci y comparar su poder discriminativo con el set de 15 loci (10), los 12 loci tradicionales (12t) (8), y un set de loci seleccionados que presentaran la más alta diversidad alélica en la población de cepas de *M. tuberculosis* en Venezuela. Por otra parte, se determinó la capacidad de la técnica de designar los aislados de *M. tuberculosis* venezolanos en su linaje correspondiente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas micobacterianas: Se analizaron un total de 469 aislados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de diferentes regiones de Venezuela (Distrito Capital, Carabobo, Delta Amacuro, Sucre, Apure y Aragua), previamente caracterizados por espoligotipaje: 352 aislados LAM, 7 Haarlem, 3 S, 25 T, 1 Beijing, 76 del ST 605 y 5 aislados únicos (16), para evaluar la capacidad del método MIRU-VNTR 24 loci en la designación de los aislados dentro de su linaje correspondiente. Posteriormente, para los estudios de discriminación, se seleccionaron al azar un total de 104 cepas pertenecientes a diferentes linajes (Tabla I). Finalmente, el análisis

de discriminación se complementó con 431 cepas pertenecientes exclusivamente al linaje LAM (STs 17, 93, 42, 60, 64, 130, 216, 960, 1367, 1694, 1691, 1696, 1698, 1702 y 0,817/LAM) y al ST 605.

TABLA I
DISTRIBUCIÓN DE 104 CEPAS
CLASIFICADAS POR FAMILIAS Y TIPOS
COMPARTIDOS

FAMILIA	ST	Numero de Cepas Analizadas
LAM2	17	25
LAM1	20	4
LAM3	33	2
S	34	2
T3	37	1
LAM9	42	11
T5	44	1
HAARLEM 1	47	2
HAARLEM 3	50	3
T1	53	6
T5_MAD2	58	1
LAM4	60	1
Haarlem1	62	1
LAM6	64	2
T1	86	1
LAM5	93	13
LAM3	130	1
BEIJING	1	1
T1	167	1
LAM9	216	1
T1	522	1
605	605	9
LAM5	960	1
LAM5	1367	1
LAM2	1691	3
LAM5	1694	1
LAM5	1696	3
LAM5	1702	3
T1	1905	1
T1	1926	1
TOTAL		104

STs: Tipos compartidos o Shared Types

Extracción del ADN: Las cepas de *M. tuberculosis* fueron recuperadas de muestras congeladas en glicerol y sembradas en medio de Lowenstein Jensen, incubadas a 37°C por 3 a 4 semanas. El ADN fue extraído usando la técnica de muerte celular por calentamiento. Se resuspendieron las colonias de *M. tuberculosis* obtenidas del medio de cultivo Lowenstein Jensen en 200 µl buffer TE (Tris-HCl 10 mM/EDTA 1mM pH 8,0), en tubos Eppendorf de 1,5 ml con tapa de seguridad. Se incubaron a 80°C-85°C por 20 a 30 min. usando un horno o en baño de María. Posteriormente, se procedió a centrifugación por 2 a 3 min. a 15000 rpm. Finalmente, se tomó el sobrenadante que contenía el ADN genómico y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. El ADN concentrado se preservó a -20°C hasta su uso (6,17).

Técnica de espoligotipaje: Fue realizada de acuerdo al protocolo internacional estandarizado (5). Las secuencias espaciadoras contenidas en el locus repetido directo se detectaron por hibridación en membranas comerciales o preparadas en el laboratorio (5). Los ADN de *M. tuberculosis* H37Rv y de *M. bovis* BCG fueron utilizados como controles positivos. El patrón de hibridación de las 43 secuencias espaciadoras fue transcrito del film a un formato Excel. Posteriormente, los espoligotipos obtenidos fueron comparados con la base de datos internacional SITVITWEB. Finalmente, los aislados fueron asignados en linajes y familias de acuerdo a las bases de datos internacionales (18).

Técnica MIRU-VNTR: Los 24 loci fueron amplificados usando multiplex PCR con los cebadores y las especificaciones del protocolo estandarizado por Supply y col. (10). Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis capilar en un secuenciador ABI 3130xl (Applied Biosystems), utilizando un marcador de peso molecular de 1000 bp marcado con el fluoróforo ROX (Bioventures). El tamaño de los amplicones y el número de repetidos se determinó con el programa Gene Mapper (PE Applied Biosystems).

Análisis de diversidad alélica y discriminación: La diversidad alélica (*h*) de cada locus MIRU-VNTR se calculó de acuerdo a lo publicado por Sola y col., 2003 (19). Los perfiles genéticos de

MIRU-VNTR y espoligotipaje, se analizaron con el programa MIRU-VNTR *plus* (20), disponible en la página web: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>. Los dendogramas se construyeron utilizando la opción "categorical" y *unweighted pair group method* (UPGMA). La discriminación de las técnicas se evaluó con la fórmula de tasa de agrupamiento (*c*) (21).

RESULTADOS

Evaluación del método MIRU-VNTR 24 loci en la designación de aislados en su linaje correspondiente.

El análisis del dendograma arrojó una amplia diversidad genética entre los 469 aislados. En ese sentido, se encontraron 276 patrones diferentes, que para efectos del presente trabajo serán denominados "mirutipos", que incluían 230 mirutipos únicos, no

asociados a clusters y 46 mirutipos que agruparon 239 aislados. El tamaño de los clusters oscilaba desde 2 hasta 53 cepas.

Los resultados fueron analizados por el programa MIRU-VNTR *plus*, que clasificaron 240 mirutipos (86,9%) en el linaje LAM, 28 (10,1%) linaje Haarlem, 2 (0,72%) linaje X, 3 (1,09%) linaje S, 1 al Beijing (0,4%) y 2 al Uganda/T (0,4%) (Fig. 1 primera y segunda partes). Posteriormente, la comparación entre el linaje asignado por MIRU-VNTR 24 loci con la designación por el método de espigotipaje demostró que el 91,3% de los patrones identificados presentaron concordancia entre los dos métodos. En ese sentido, se observó que hubo una excelente analogía entre los mirutipos y espigotipos para los linajes LAM, Haarlem, S, X y Beijing. Sin embargo, no se observó correspondencia con el linaje T, ya que los mirutipos presentaron relación con otros tipos de linajes como Haarlem y LAM.

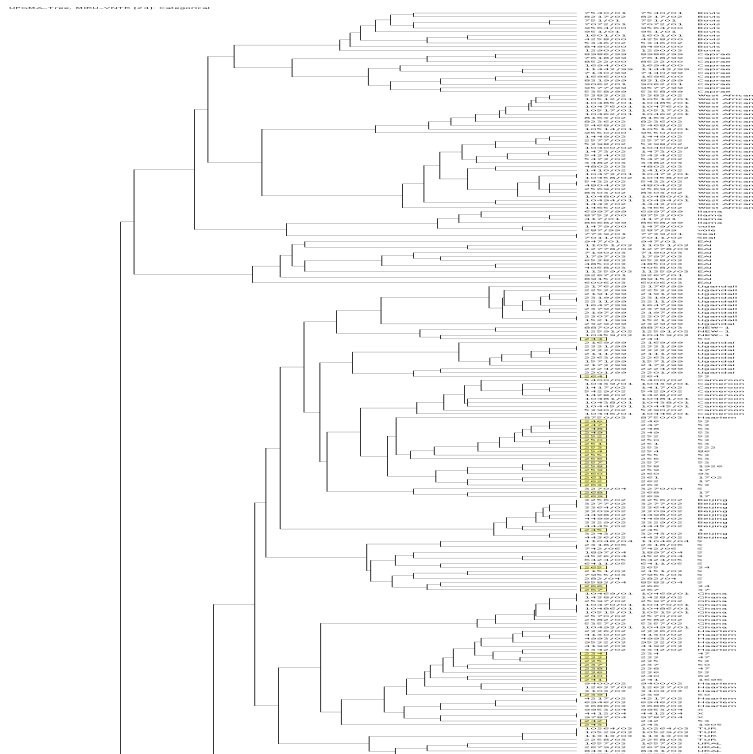


Fig. 1. Primera Parte. Dendograma basado en la comparación con la base de datos internacional y 276 patrones de MIRU-VNTR analizados en el presente estudio (cuadros amarillos), usando *unweighted pair group method* (UPGMA) y el coeficiente categorial.

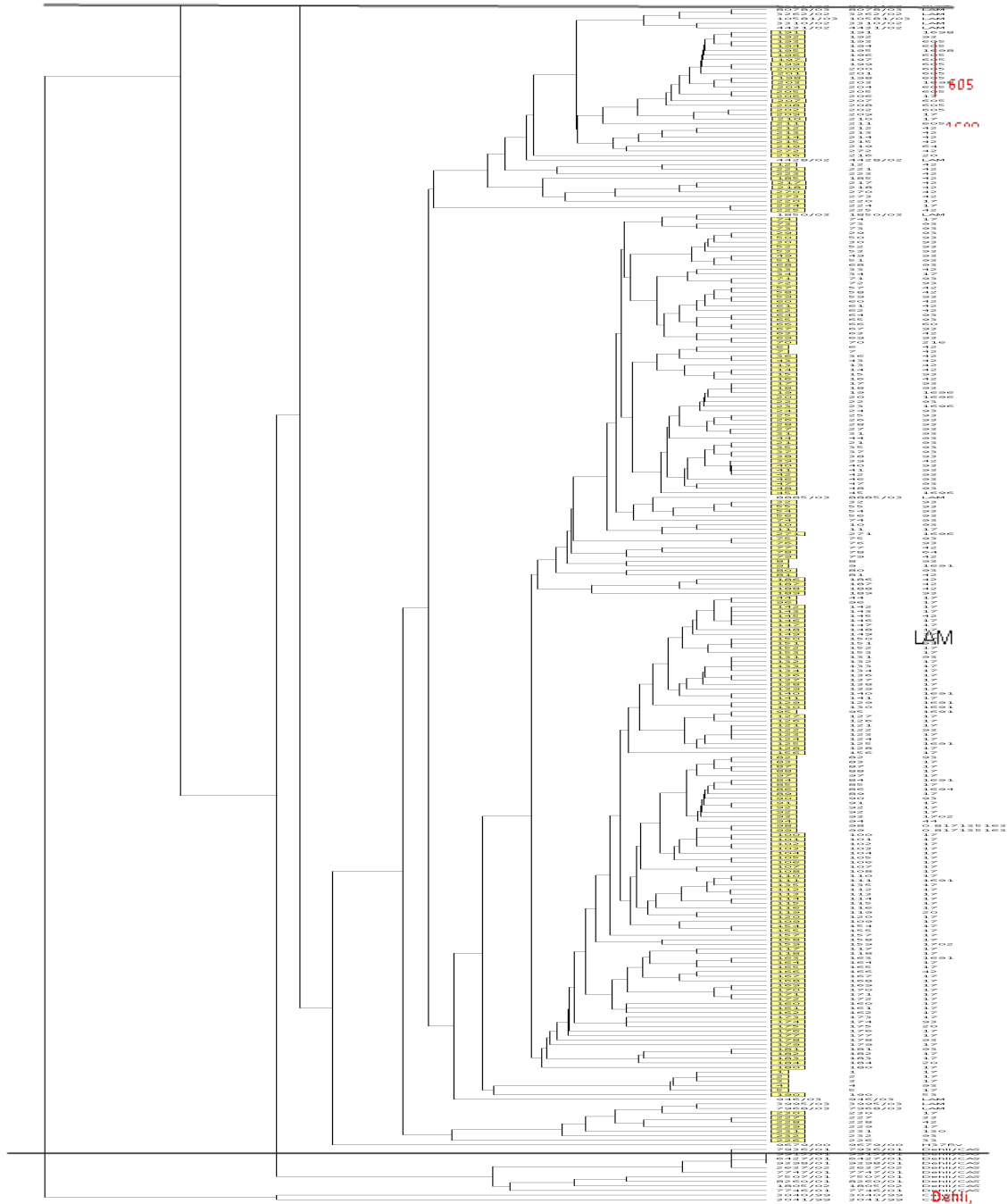


Fig. 1. Segunda Parte. Dendrograma basado en la comparación con la base de datos internacional y 276 patrones de MIRU-VNTR analizados en el presente estudio (cuadros amarillos), usando *unweighted pair group method* (UPGMA) y el coeficiente categorial.

Análisis de la diversidad alélica:

Los resultados obtenidos sugieren que existen diferencias entre la capacidad discriminadora de los diferentes loci MIRU-VNTR en las cepas analizadas. La diversidad alélica más alta fue encontrada en el locus 4052 (QUB 26), seguido de los loci 2163b (QUB11b), 2996 (MIRU26) y 424 (Mtub04). De acuerdo con los valores de discriminación (*h*), se observó que estos cuatro loci fueron altamente discriminatorios en ambos grupos de cepas analizados. En los dos grupos, fue posible observar que los loci 154 (MIRU02), 577 (ETRC), 802 (MIRU40), 1644 (MIRU 16), 2461 (ETRB), 3171 (Mtub34) y 3192 (MIRU 31) resultaron ser moderadamente discriminatorios, mientras los loci

580 (MIRU04), 2059 (MIRU20), 2347 (Mtub29), 2687 (MIRU24) y 3007 (MIRU27) mostraron ser poco discriminatorios, y el locus 2687 (MIRU24) presentó una diversidad alélica nula. Adicionalmente, se encontraron diferencias en la diversidad alélica entre el grupo de 104 aislados y el grupo de cepas LAM y el ST 605. En ese sentido, mientras los loci MIRU-VNTR 2531 (MIRU23), 3690 (Mtub39), 1955 (Mtub21), 2165 (ETRA), 2401 (Mtub30), 960 (MIRU10), presentaron moderada discriminación en los 104 aislados de diferentes linajes, en el grupo de 431 aislados LAM y del ST 605 que representan la mayoría de los genotipos en Venezuela, se encontró poca discriminación (Tabla II).

TABLA II
DIVERSIDAD ALÉLICA EN 104 AISLADOS DE DIFERENTES LINAJES Y 431 AISLADOS CLÍNICOS PERTENECIENTES AL LINAJE LAM Y EL ST 605 DE *M. TUBERCULOSIS*

LOCUS/ALIAS	DIVERSIDAD ALÉLICA N=104	DIVERSIDAD ALÉLICA N=431 (LAM y ST 605)
2687/MIRU24	0.00	0.00
2347/Mtub29	0.03	0.06
4348/MIRU39	0.07	0.04
580/MIRU04	0.08	0.03
2059/MIRU20	0.08	0.05
3007/MIRU27	0.12	0.13
4156/QUB4156	0.28	0.10
154/MIRU02	0.30	0.36
577/ETRC	0.35	0.39
2531/MIRU23	0.36	0.13
3690/Mtub39	0.35	0.09
1955/Mtub21	0.36	0.09
2165/ETRA	0.37	0.11
2401/Mtub30	0.39	0.07
2461/ETRB	0.41	0.45
3192/MIRU31	0.41	0.45
960/MIRU10	0.47	0.23
1644/MIRU16	0.52	0.46
3171/Mtub34	0.53	0.51
802/MIRU40	0.56	0.38
424/Mtub04	0.64	0.63
2996/MIRU26	0.7	0.69
2163b/QUB11b	0.72	0.66
4052/QUB26	0.85	0.77

Altamente discriminatorio: >0.6
Moderadamente discriminatorio 0.3-0.6
Pobremamente discriminatorio: <0.3

Análisis de las tasas de agrupamiento, discriminación y comparación con la técnica de espoligotipaje:

Los resultados mostraron que MIRU-VNTR con 24 loci es más discriminatorio que la técnica de espoligotipaje en ambos grupos (Tabla III), detectando un mayor número de patrones genéticos diferentes. Por otra parte, MIRU-VNTR 24 loci, espoligotipaje y la combinación MIRU VNTR 24 loci y espoligotipaje, mostraron mayor discriminación en el grupo de 104 aislados que en el grupo de 431 cepas LAM y ST 605, según los valores de la tasa de agrupamiento, el porcentaje de aislados no agrupados y el porcentaje de aislados agrupados. Finalmente, fue posible evidenciar que la combinación de MIRU-VNTR 24 loci con espoligotipaje incrementó ligeramente la diferenciación genética, evidenciándose una disminución en la tasa de agrupamiento, y un aumento en el número de genotipos distintos detectados en los dos grupos de cepas estudiadas.

Evaluación de diferentes combinaciones de loci MIRU-VNTR

La evaluación de las combinaciones de diferentes loci MIRU-VNTR se realizó con la finalidad de encontrar un número reducido de loci que generara una discriminación aproximada a la de 24 y 15 loci en los aislados de *M. tuberculosis* venezolanos. Para el análisis se incluyó la combinación de 12 loci tradicionales (12t), los cuatro loci que mostraron la más alta diversidad alélica en la presente investigación, y una combinación de 12 loci que fueron denominados 12inv, que incluyeron los 4 loci con más alta diversidad alélica y 8 loci que poseían una discriminación moderada en el grupo de 431 aislados del presente estudio. Los resultados revelaron que la técnica presenta una excelente resolución para las combinaciones de 15, 12inv y 4 loci. De ellas, las combinaciones de 15 y 12inv permitieron diferenciar un mayor número de genotipos con respecto a la combinación de 4 loci. Todas las combinaciones de loci MIRU-VNTR,

TABLA III
ANÁLISIS POR MÉTODO DE TIPIFICACIÓN GENÉTICA (ESPOLIGOTIPAJE Y MIRU-VNTR 24 LOCI) EN 104 AISLADOS DE DIFERENTES ESPOLIGOTIPOS Y 431 AISLADOS DE LA FAMILIA LAM Y EL ST605.

Método de Tipificación Genética (Número de cepas probadas)						
Parámetros que evalúan la Discriminación	MIRU-VNTR 24 loci (104)	MIRU-VNTR 24 loci (431)	ESPOLIGOTIPAJE (104)	ESPOLIGOTIPAJE (431)	Combinación MIRU-VNTR 24 loci y ESPOLIGOTIPAJE (104)	Combinación MIRU-VNTR 24 loci y ESPOLIGOTIPAJE (431)
Tasa de Agrupamiento (c)	18,27 %	43,2 %	71,15 %	95,82 %	14,4 %	37,4 %
Número de Cluster	8	43	14	12	8	40
Aislados Agrupados (%)	27 (25,96)	228 (52,9)	88 (84,62)	425 (98,6)	23 (22,12)	210 (46,6)
Aislados no agrupados en cluster (%)	77 (74,04)	203 (47,1)	16 (15,38)	6 (1,4)	81 (77,8)	250 (53,4)
Patrones Diferentes	85	246	30	18	89	270

incluyendo solo los 4 loci con la más alta diversidad alélica, mostraron ser más discriminatorios que la combinación 12t. Por otra parte, fue posible observar que el acoplamiento de espilogotipaje con cada combinación incrementó la resolución. Se observaron pequeñas diferencias en la discriminación genética generada entre la combinación de 12inv y 15 loci para los 104 aislados. Las tasas de agrupamiento obtenidas para 15 loci fueron de 21% para MIRU-VNTR y de 15% para MIRU-VNTR acoplado a espilogotipaje, mientras que para 12inv fue de 23% para MIRU-VNTR y de 17% para MIRU-VNTR combinado con espilogotipaje. En el caso de los 431 aislados, se observaron valores similares en las tasas de agrupamiento para 12inv y 15 loci, siendo de 52% para MIRU y de 46% para MIRU VNTR acoplado a espilogotipaje. Relacionado al número

de patrones genéticos diferentes, no se observó diferencia para 12inv y 15 loci en la aplicación de MIRU-VNTR acoplado a espilogotipaje en el grupo de 104 aislados, con valores de 88 patrones diferentes. De igual manera, no se obtuvo diferencia en el grupo de 431 aislados cuando se evaluaron con MIRU-VNTR, donde se encontraron 207 genotipos diferentes. Ligeras diferencias fueron halladas en los 431 aislados cuando se combinó MIRU-VNTR y espilogotipaje, con valores de 230 genotipos diferentes para 12inv y 232 para 15 loci. Los valores de las tasas de agrupamiento y patrones diferentes de 24 loci MIRU-VNTR presentaron marcadas diferencias en las 431 cepas y en las 104 aislados cuando se compararon con 12inv y 15 loci. (Figs. 2A y 2B).

MIRU-VNTR LOCUS/ALIAS	Combinación de loci propuestas por Supply y col [2005] (13)			
	24	15	12	10
580/MIRU4/ETRD	X	X		X
2996/MIRU26	X	X	X	X
802/MIRU49	X	X	X	X
960/MIRU10	X	X	X	X
1644/MIRU16	X	X	X	
3192/MIRU31/ETRE	X	X	X	X
424/Mtb64	X	X	X	
577/ETRC	X	X	X	X
2165/ETRA	X	X	X	X
2401/Mtb30	X	X		
3690/Mtb39	X	X	X	X
4156/QUB4156	X	X		
2163b/QUB116	X	X	X	X
1955/Mtb21	X	X	X	X
4052/QUB26	X	X	X	X
154/MIRU2	X			
2531/MIRU23	X			
4348/MIRU39	X			
2059/MIRU20	X			
2687/MIRU24	X			
3007/MIRU27/QUB5	X			
2347/Mtb29	X			
2461/ETRB	X			
3171/Mtb34	X			

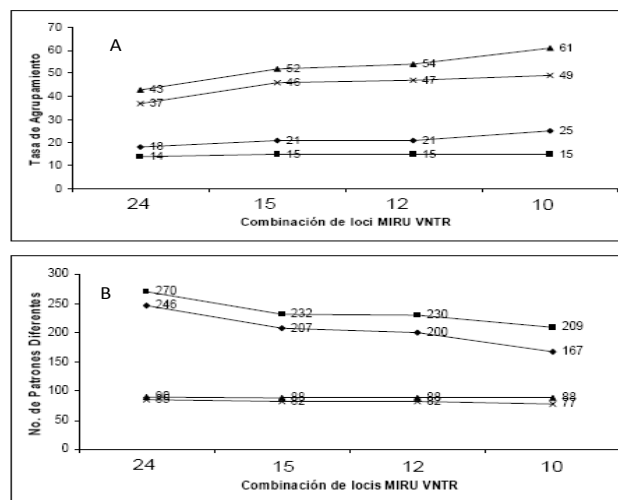


Fig. 2. Discriminación del Método MIRU-VNTR solo o en combinación con espilogotipaje. **(A) Tasas de agrupamiento.** En el eje de las y esta el porcentaje de las tasas de agrupamiento. El eje de las X representa las tasas de agrupamiento. Los diamantes (◆) y cuadrados (■) corresponden a los valores obtenidos en 104 cepas de MIRU-VNTR solo y combinado con espilogotipaje respectivamente. Los triángulos (▲) y las equis (×) representan los valores en 431 aislados para MIRU-VNTR solo y combinado con espilogotipaje respectivamente. **(B) Patrones Diferentes.** El eje de las y representa el número de patrones diferentes. El eje de las x representa las diferentes combinaciones de locis MIRU-VNTR como fueron definidos en la tabla anexa. Los diamantes (◆) y cuadrados (■) corresponden a los valores obtenidos en 431 cepas de MIRU-VNTR solo y combinado con espilogotipaje respectivamente. Los triángulos (▲) y equis (×) representan los valores en 104 aislados para MIRU-VNTR solo y combinado con espilogotipaje respectivamente

DISCUSIÓN

Para un método de epidemiología molecular, el hecho de asignar genotipos en el linaje correspondiente es importante, dado que sugiere que la técnica puede ser aplicada a estudios de evolución y análisis filogeográficos. Los resultados demostraron una excelente consistencia en la clasificación por linajes empleando el método MIRU-VNTR 24 loci comparado con espigotipaje. Hallazgos similares han sido reportados previamente y han sugerido que la asignación de linajes por MIRU-VNTR 24 loci posee correspondencia con espigotipaje, Polimorfismo Nucleótido Sinónimo (PNS) y Largas Secuencia de Polimorfismo (LSP) (20, 22, 23). Con respecto a los miembros del linaje T, no se encontró buena concordancia, lo cual también ha sido reportado con anterioridad (20). Estudios previos con marcadores genéticos como PNS sugieren que los miembros del linaje T constituyen cepas genéticamente heterogéneas, y pueden encontrarse asociados a diferentes grupos genéticos, entre ellos, el linaje LAM y Haarlem (24).

El análisis de la diversidad alélica reveló que los loci 4052 (QUB26), 2163b (QUB11b), 2996 (MIRU26), 424 (Mtub04) son los más polimórficos, lo que podría indicar que evolucionen de manera más rápida entre los linajes de *M. tuberculosis* incluidos en el presente estudio. Resultados similares fueron publicados previamente (10). Sin embargo, se encontraron diferencias en el polimorfismo del resto de los loci MIRU-VNTR con respecto a otras publicaciones (10, 22). En la presente investigación se observó que los loci 2347 (Mtub29), 4348 (MIRU39) y 580 (MIRU04), son poco discriminatorios, contrario a los estudios de Supply y col.(17) y Valcheva y col.(25), quienes demostraron que son moderadamente discriminatorios. Otras diferencias fueron observadas cuando se obtuvo moderada discriminación en los loci 154 (MIRU02), 2461 (ETRB), 3192 (MIRU31) y 3171 (Mtub34), diferente a las observaciones halladas por los estudios anteriormente citados, donde encontraron que cada uno de ellos generaba poca discriminación. Los loci 802 (MIRU40), 577 (ETRC), 2531 (MIRU23), 3690

(Mtub39), 1955 (Mtub21), 2165 (ETRA), 2401 (Mtub30) y 960 (MIRU10), han sido reportados como altamente discriminatorios (7, 17, 22, 26), sin embargo, los resultados del presente estudio indican que poseen una discriminación moderada.

En ese sentido, es posible inferir que las discrepancias encontradas podrían estar relacionadas al origen geográfico del aislado, al genotipo circulante en un área geográfica específica, y la variabilidad existente entre los diferentes grupos genéticos. En el estudio de Valcheva y col. (25) realizado en Bulgaria, la mayoría de los aislados pertenecían al Linaje S. En el caso de la investigación de Supply y col. (10), estudiaron una población de 824 aislados de diferentes regiones geográficas y representantes de los principales linajes en el mundo, lo que explicaría el alto grado de polimorfismo encontrado en su investigación. En el presente estudio, se hallaron diferencias en la diversidad alélica entre el grupo de las 104 cepas analizadas y el grupo de 431 aislados en los loci MIRU-VNTR 2531 (MIRU23), 3690 (Mtub39), 1955 (Mtub21), 2165 (ETRA), 2401 (Mtub30), 960 (MIRU10). Los resultados podrían estar relacionados a la diversidad genética del grupo de los 104 aislados, quienes estaban representados por varios linajes, mientras que, el grupo de 431 aislados clínicos pertenecían principalmente al linaje LAM predominante en el país y al ST 605 o cepa Carabobo, único en Venezuela (16).

La presencia de genotipos únicos aislados en regiones geográficas específicas de Venezuela, como el caso de los STs 1691, 1696, 1698, 1702 y la cepa Carabobo, así como el predominio de los STs 17, 93, 42 y 53 previamente descritos (16), indujo a evaluar la discriminación de espigotipaje, MIRU-VNTR 24 loci y la combinación de ambos en un grupo de aislados con diversidad genética y otro grupo que representara una distribución de genotipos similar a los descritos en Venezuela. En ese orden de ideas, la técnica de espigotipaje mostró ser menos discriminatoria con respecto a MIRU-VNTR 24 loci como ha sido descrito anteriormente (3, 10, 24, 27), y cuando espigotipaje fue acoplado a MIRU-VNTR 24 loci, en el grupo de 104 aislados con diversidad genética, la detección en el número de clusters apenas se incrementó ligeramente, como

ha sido demostrado en investigaciones previas (9, 10, 27-29). Sin embargo, cuando la combinación de ambas técnicas fue utilizado en el análisis de 431 cepas, el número de patrones diferentes mejoró considerablemente, debido principalmente a la subdivisión por espilogotipaje en ciertos clusters definidos por MIRU-VNTR 24 loci. Se pudo constatar, que espilogotipaje subdividió únicamente 2 clusters de MIRU-VNTR 24 loci. Las cepas de los ST1698 y ST 605 conformaron un cluster por MIRU-VNTR 24 loci, pero el uso adicional de la técnica de espilogotipaje las subdividió, ya que la cepa 1698 posee un espaciador adicional en la posición 15. Un caso similar se presentó con otro cluster, conformado por aislados del ST1696 y ST93, idénticas por MIRU-VNTR 24 loci, donde la subdivisión generada por espilogotipaje se debió a la diferencia en 3 secuencias espaciadoras adicionales (posiciones 4,5 y 6) en los aislados del ST1696.

Con base a este hallazgo, inicialmente fue posible sugerir la aplicación de la combinación de MIRU-VNTR 24 loci y espilogotipaje en estudios epidemiológicos en Venezuela, con el fin de lograr un mayor grado de diferenciación y así definir con mayor certeza posibles brotes y transmisión de la TB. Además, el presente estudio demostró que la combinación de 15 loci detectó menos genotipos que el formato de 24 loci, como ha sido reportado previamente (27, 28). Sin embargo, todas las combinaciones de loci MIRU-VNTR ensayadas, incluyendo los 4 loci más discriminativos, resultaron ser más discriminatorios que la combinación 12t, como fue demostrado en un estudio previo (10). Este resultado permitió proponer una nueva combinación de 12 loci MIRU-VNTR (12inv) para los genotipos circulantes en el país, basado en los 4 loci con mas alta diversidad alélica, acoplados con otros 8 loci moderadamente discriminativos, que juntos proporcionaron una discriminación similar a los 15 loci MIRU-VNTR propuestos por Supply y col., en el 2006 (10) y superior al formato 12t propuesto en el año 2001 (8). Por otra parte, la adición de espilogotipaje a cada combinación MIRU-VNTR mejoró la diferenciación genética.

Estos últimos resultados, sugieren que la combinación 12inv acoplado a espilogotipaje,

podiese ser utilizado para la detección de brotes y transmisión, ya que los valores obtenidos para la diferenciación de patrones genéticos y tasas de agrupamiento son próximos a los obtenidos para el formato de 15 loci acoplado a espilogotipaje. Investigaciones previas, han propuesto el uso de un reducido numero de loci MIRU-VNTR, para discriminar genotipos particulares según la región geográfica del aislado, como lo son el caso de Shamputa y col., en Korea (29), y Zhou y col., en China (30), aplicados todos al genotipo Beijing que circula principalmente en el continente Asiático. Recientemente, Asante-Poku y col. (31), propusieron el uso de un total de 8 loci MIRU-VNTR con la suficiente discriminación para los estudios de EM de los linajes 4 y 5 de *M. africanum* en Ghana.

Finalmente, quedó demostrado que el uso de un número reducido de loci MIRU-VNTR acoplado a espilogotipaje, en este caso 12 inv loci MIRU VNTR, permitirá investigar la transmisión de la TB, reducir tiempo y costos, y plantea el uso apropiado de las técnicas de EM para estudios de *M. tuberculosis* en Venezuela, por lo que adicionalmente, se sugiere que en regiones geográficas con distribución de genotipos particulares, sean evaluadas las diversidades alélicas para así optimizar el uso de las combinaciones de loci MIRU-VNTR.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Philip Supply y Eve Willeri del Instituto Pasteur de Lillé-Francia por su invaluable aporte en el entrenamiento de la técnica MIRU-VNTR 24 loci. Al Centro de Análisis de Secuencias Nacional (Cesaan)-Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. A los entes financiadores, FONACIT, Programa Alma Mater, CDCH UC, y FONACIT Proyecto G-2005000393.

REFERENCIAS

1. **Organización Mundial de la Salud.** Global tuberculosis report. 2014. Geneva: Organización Mundial de la Salud, 2014.

2. **Organización Mundial de la Salud.** Global tuberculosis control: WHO report 2011. Geneva: Organización Mundial de la Salud; 2011.
3. **Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas W, Hermans M, Martin C, Palittapongarnpim P, Plikaytis B, Riley L, Yakrus M, Musser J, van Embden J.** Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing *M. tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2607–2618.
4. **Van Soolingen D.** Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001; 249: 1–26.
5. **Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld A, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J.** Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *M. tuberculosis* for diagnosis and tuberculosis control. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907–914.
6. **Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P.** CRISPR-a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Micro* 2008; 6(3): 181-186.
7. **Cowan L, Diem L, Monson T, Wand P, Temporado D, Oemig T, Crawford T.** Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 2005; 43:688–695.
8. **Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C.** Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3563–3571.
9. **Oelemann M, Diel R, Vatin V, Haas W, Rusch-Gerdes S, Locht C, Niemann S, Supply P.** Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 691–697.
10. **Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsche-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D.** Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4498–4510.
11. **De Beer JL, Akkerman OW, Schürch AC, Mulder A.** Optimization of standard in-house 24-locus variable-number tandem-repeat typing for *Mycobacterium tuberculosis* and its direct application to clinical material. *J Clin Microbiol* 2014; 52(5): 1338-42.
12. **Smittipat N, Billamas P, Palittapongarnpim M, Thong-On A, Temu M, Thanakijcharoen P, Karnkawinpong O, Palittapongarnpim P.** Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5034–5043.
13. **Dou H, Lu J, Lin C, Chang J, Sun J, Su, I.** Utility and evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for genotyping Mycobacterial tuberculosis isolates. *J Microbiol Methods* 2009; 77 (1): 127-129.
14. **Jiao W, Mokrousov I, Sun G, Guo Y, Vyazovaya A, Narvskaya O, Dong A.** Evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for typing *Mycobacterium tuberculosis* with Beijing genotype isolates from Beijing, China. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1045-1049.
15. **Maes M, Kremer K, van Soolingen D, Takiff H, de Waard JH.** 24-locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. *Tuberculosis* 2008; 88(5): 490-494.
16. **Abadia E, Sequera M, Ortega D, Méndez MV, Escalona A, Da Mata O, Izarra E, Rojas Y, Jaspé R, Motiwala AS, Alland D, de Waard J, Takiff HE.** *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR 24. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 122-130.
17. **Gandhi N, Moll A, Sturm A, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, Zeller K, Andrews J, Friedland G.** Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 2006; 368: 1575-1580.
18. **Brudey K, Driscoll J, Rigouts L, Prodinge W, Gori A, Al hahoj S, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans J, Fauville-Dufaux M, Ferdinand**

- S, de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes H, Gutierrez MC, Hawkey P, van Helden P, Kadival G, Kreiswirth B, Kremer K, Kubin M. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 2006; 6: 23-30
19. Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, Rastogi N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infect Genet Evol 2003; 3(2): 125-133.
 20. Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. 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. J Clin Microbiol 2008; 46: 2692-2699.
 21. Small P, Hopewell P, Singh S, Paz A, Parsonnet J, Ruston D, Schecter G, Daley C, Schoolnik G. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med 1994; 330: 1703-1709.
 22. Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguéc C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, van Soolingen D, Rüsç-Gerdes S, Locht C, Brisse S, Meyer A, Supply P, Niemann S. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PLoS Pathog 2008; 4: e10000146.
 23. Cardoso M, Gomes H, Willery E, Posuelo L, Batista K, Allix Beguec C, Locht C, Goguet de la Salmoniere Y, Gutierrez M, Suffys P, Supply P. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain lineage from a high tuberculosis burden country. PLoS One 2011; 6(3): e18256.
 24. Filliol I, Motiwala S, Cavatore M, Weihong Qi, Hernando M, Bobadilla M, Fyfe J, García J, Rastogi N, Sola C, Zozio T, Guerrero M, León C, Crabtree J, Angiuoli S, Eisenach K, Durmaz R, Joloba M, Rendón A, Sifuentes-Osornio J, Ponce de León J, Cave MD, Fleischmann R, Whittam T, Alland D. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a Minimal Standard SNP Set. J Bacteriol 2006; 188: 759-772.
 25. Valcheva V, Mokrousov I, Narvskaya O, Rastogi N, Markova N. Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria. J Clin Microbiol 2008; 46: 3005-3008.
 26. Bouklata N, Supply P, Jaouhari S, Charof R, Seghrouchni F, Sadki K, El Achhab K, Nejari C, Filali-Maltouf A, Lahlou O, El Aouad R. Molecular typing of *Mycobacterium Tuberculosis* complex by 24-locus based MIRU-VNTR typing in conjunction with spoligotyping to assess genetic diversity of strains circulating in Morocco. PLoS One 2015; DOI:10.1371/journal.pone.0135695
 27. Pitondo A., Barreto AC, Jolley K, Queico C, da Costa A. Comparison of three molecular typing methods to assess genetic diversity for *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol Methods 2013; 93: 42-48
 28. Christianson S, Wolfe J, Orr P, Karlowsky J, Levett PN, Horsman GB, Thibert L, Tang P, Sharma M. Evaluation of 24 locus MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Canada. Tuberculosis 2010; 90 (1): 31-38.
 29. Shamputa IC, Lee J, Allix-Beguec C, Cho E-J, Rajan V, Lee J, Rajan V, Lee E, Min JH, Carroll M, Goldfeder L, Kim JH, Kang H, Hwang S, Eum S, Kyu Park S, Lee H, Supply P, Nae Cho S, Via L, Clifton EB. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from tertiary care tuberculosis hospital in South Korea. J Clin Microbiol 2010; 48(2): 387-394.
 30. Zhou A, Nawaz M, Xue X, Karakousis PC, Yao Y, Xu J. Molecular genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in Xi'an, China using MIRU-VNTR typing. Int J Tuberc Lung Dis 2011; 15(4): 517-522.
 31. Asante-Poku A, Nyaho MS, Borrell S, Comas I, Gagneux S, Yeboah-Manu D. Evaluation of customised lineage-specific sets of MIRU-VNTR loci for genotyping *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Ghana. PLoS One 2014; 9(3):e92675. doi:10.1371/journal.pone.0092675.