Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Genómica comparativa en micobacterias responsables de enfermedades zoonóticas pertenecientes al Complejo Mycobacterium tuberculosis

Caimi, Karina Cynthia

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Caimi, Karina Cynthia. (2004). Genómica comparativa en micobacterias responsables de enfermedades zoonóticas pertenecientes al Complejo Mycobacterium tuberculosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3724_Caimi

Cita tipo Chicago:
Caimi, Karina Cynthia. "Genómica comparativa en micobacterias responsables de enfermedades zoonóticas pertenecientes al Complejo Mycobacterium tuberculosis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3724_Caimi

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

FCE y N BIBLIOTECA

"Genómica comparativa en micobacterias responsables de enfermedades zoonóticas pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis*"

Lic. Karina Cynthia Caimi

Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Angel Adrián Cataldi

Instituto de Biotecnología.
Centro de Investigación en Ciencias Agronómicas y Veterinarias.
INTA Castelar.
Junio 2004

3704

RESUMEN

El Complejo *M. tuberculosis* (CMT) está formado por distintas especies de micobacterias entre las que se encuentra el agente causal de la tuberculosis en humanos, *Mycobacterium tuberculosis* y micobacterias responsables de enfermedades zoonóticas como *M. bovis, M. microti* y *M. pinnipedii.* La genómica comparativa en micobacterias brinda una vasta información acerca de la relación entre los genomas de distintas micobacterias pertenecientes al CMT.

En la primera parte de este trabajo se estudió la Región de Repeticiones Directas (DR). Esta región está compuesta por repeticiones directas conservadas de 36pb separadas por secuencias no repetitivas llamadas espaciadores (sps). El polimorfismo observado en esta región entre aislamientos de micobacterias pertenecientes al CMT dio origen a la técnica de tipificación, ampliamente aplicada en tuberculosis denominada Spoligotyping. La secuenciación y comparación de la región DR entre distintos aislamientos argentinos de *M. bovis* permitió encontrar 5 espaciadores nuevos. Estos espaciadores conjuntamente con una colección de otros descriptos previamente, fueron incluidos en una nueva membrana de spoligotyping obteniéndose un total de 104 espaciadores. La utilización del spoligotyping de 104-sps. permitió la diferenciación de aislamientos del CMT en 174 spoligotipos, mientras que el uso de la membrana tradicional tipificó estos mismos aislamientos en 160 spoligotipos distintos. Particularmente para *M. bovis* se obtuvo un incremento de 17 a 26 spoligotipos respectivamente. El análisis comparativo *in silico* en micobacterias no pertenecientes al CMT como *M. smegmatis, M. avium, M. marinum* y *M. leprae,* permitió establecer que los marcos de lectura abiertos (MLAs) flanqueantes a la Región DR de *M. tuberculosis,* se encuentran adyacentes entre sí en estas otras micobacterias. En cambio en el genoma de *M. tuberculosis* esta región comprende 24kb. que incluyen 23 MLAs así como la región DR ausentes en las mencionadas micobacterias. Este resultado fue corroborado *in vitro* mediante amplificación por PCR. Debido a la ausencia del *locus* DR descripto y los MLAs adyacentes, en *M. avium* y *M. smegmatis* y debido a que estas micobacterias fueron descriptas como más antiguas que *M. tuberculosis,* se postula que esta región podría haber sido adquirida por las especies del CMT o por un ancestro común a ellas a lo largo del proceso evolutivo.

La segunda parte de este trabajo implicó el estudio de la variabilidad genética entre distintos aislamientos de *M. bovis, M. microti* y *M. pinnipedii,* estas últimas responsables de tuberculosis en ratones de campo denominados "vole" y en mamíferos marinos respectivamente, mediante comparación de genomas completos. Se encontró una nueva deleción en *M. microti* denominada MiD4. Esta región remueve 5 genes que codifican para antígenos de la familia ESAT-6 y PE-PPE. En *M. pinnipedii* se encontraron dos nuevas deleciones, PiD1 que removió dos genes, uno de los cuales codifica para una oxidoreductasa (Rv3530c) involucrada en el metabolismo celular. La segunda deleción PiD2, fue denominada como RD2*seal* debido a estar superpuesta con la región de 10.7kb, RD2, ausente en algunas *M. bovis* BCG. Esta región abarca los genes Rv1977 y Rv1978. Los experimentos de Southern blot mostraron que MiD4 está también ausente en *M. pinnipedii,* en cambio PiD1 es una deleción específica para *M. pinnipedii.* Por otra parte mediante la comparación del genoma de *M. bovis* con el genoma de *M. tuberculosis in silico,* se pudieron identificar nuevos marcadores capaces de diferenciar entre estas dos especies y respecto de otras especies del CMT. Uno de estos nuevos marcadores denominado *rpf*A presentó polimorfismos en los aislamientos de *M. bovis* estudiados, lo que podría ser usado en la tipificación y diferenciación.

ABSTRACT

The *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) is composed by different mycobacteria species, the agent of human tuberculosis and mycobacteria responsible of zoonotic disease as *M. bovis, M. microti* and *M. pinnipedii* are among them. Comparative genomics gives broad information about the relationship between the different micobacterial genomes of the MTC. In the first part of this work the Direct Repeat (DR) region was studied. The DR region is composed of multiple well-conserved 36-bp DRs interspersed with non-repetitive DNA spacer sequences (sps). The polymorphism in the DR region has led to the development of a methodology highly applied in tuberculosis research called Spoligotyping. Upon analysis of this region in argentine bovine isolates of *M. bovis*, five new spacers were detected. These spacers and a collection of others previously described were included in a new spoligotyping membrane reaching a total of 104 different spacers. The application of the 104-sps spoligotyping allows the differentiation of isolates from the MTC in 174 spoligotypes while with the application of the traditional membrane 160 spoligotypes were obtained. The discriminatory power of *M. bovis* isolates was increased from 17 to 26 different patterns respectively. The comparative analysis *in silico* performed in mycobacteria not-belonging to the MTC as *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. marinum* and *M. leprae* allow to establish that the open reading frames (ORFs) flanking the DR region of *M. tuberculosis* are adjacent in these mycobacteria. In *M. tuberculosis* genome, this fragment includes 24kb. with 23 ORFs absent from the referred mycobacteria. This observation was experimentally confirmed by PCR. As the DR *locus* and the ORFs around it, are absent in *M. smegmatis* and *M. avium* and, as it is possible that these species are older than *M. tuberculosis*, we postulated that the DR *locus* was acquired by the MTC species or by an ancestor bacterium during evolutionary process.

In the second part of this work the genetic variability of different isolates of *M. bovis, M. microti* and *M. pinnipedii,* these last species agents of tuberculosis in wild voles and marine mammals respectively, was studied by whole genome sequence analysis. A novel *M. microti* deletion was found here called MiD4. This region removes 5 genes that code for ESAT-6 family antigens and PE-PPE. Two new deletions were found in the *M. pinnipedii* isolates: PiD1, which removes two genes where one of them code for an oxidoreductase (Rv3530c) involved in cellular metabolism. A second deletion found in *M. pinnipedii* isolates, PiD2, has been recently defined as RD2seal since it overlaps the 10,7 kb RD2 region. This region encompasses Rv1977 and Rv1978 genes. Southern blot experiments showed that MID4 was also deleted from *M pinnipedii,* but PID1 is a deletion specific to *M. pinnipedii.* By the other hand the analysis *in silico* between the *M. bovis* and *M. tuberculosis* genomes, allow the identification of new markers. These markers were used to differentiate between both species and from another species One of these new markers called *rpf*A, present polymorphism between *M. bovis* isolates. This polymorphism could be used in typification and differentiation.

1. INDICE

1.	**Indice**	1
2.	**Abreviaturas**	4
3.	**Introducción**	5
3.1.	Introducción general a la tuberculosis	5
3.2.	Reseña Histórica	6
3.3.	Generalidades del género *Mycobacterium sp.*	8
3.4.	Características generales de las micobacterias	11
3.4.1.	Estructura de la pared celular	11
3.4.2.	Replicación	13
3.5.	Patogenicidad	14
3.6.	Respuesta inmune a la tuberculosis	16
3.7.	Resistencia a drogas en tuberculosis	18
3.8.	Identificación de factores de virulencia en micobacterias	19
3.9.	Tuberculosis Humana en Argentina	22
3.10.1.	*Mycobacterium bovis*	23
3.10.2..	*Mycobacterium bovis* en bovinos	24
3.10.3.	Tuberculosis Bovina (TBB)en Argentina	24
3.10.4.	*Mycobacterium bovis* en humanos	25
3.11.	Epidemiología	27
3.11.1.	Epidemiología molecular en micobacterias	28
3.11.2.	Spoligotyping	31
3.11.3.	Spoligotyping en *M. bovis*	34
3.12.	Genómica en *M. tuberculosis*	34
3.12.1.	Familia de proteínas PE y PPE	37
3.12.2.	Familia de proteínas ESAT	38
3.13.	Genómica en *M. bovis*	39
3.14	Genómica en *M. microti*	43
3.15.	Genómica Comparativa	45
3.16.	Evolución del Complejo *M. tuberculosis*	48
4.	**Hipótesis**	51
5.	**Objetivos**	52
6.	**Materiales y Métodos**	53
6.1.1	Cepas utilizadas	53
6.1.2.	Cultivo de las bacterias	54
6.2.	Extracción de ADN genómico	54
6.3.	Estudio de la Región DR	55
6.3.1.	Elección de los aislamientos	55
6.3.2.	Amplificación por PCR de la Región DR	56
6.3.3.	Clonado de los productos de amplificación	58
6.3.4.	Transformación y aislamiento de los plásmidos recombinantes	59
6.3.5.	Secuenciación de los insertos y análisis de las secuencias	59
6.3.6.	Análisis de la frecuencia de aparición de los nuevos espaciadores y estudio de su poder discriminatorio	60

6.4.1.	Inclusión de los nuevos espaciadores en una nueva membrana de spoligotyping	60
6.4.2.	Realización del Spoligotyping de nueva generación.	63
6.4.3.	Colección de los aislamientos utilizados en la evaluación del spoligotyping de nueva generación.	63
6.4.4.	Determinación del poder discriminatorio de los 104 espaciadores individualmente.	64
6.5.	Estudio de la región DR en micobacterias no pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*	64
6.5.1.	Análisis *in silico.*	64
6.5.2.	Análisis *in vitro.*	65
6.6.	Utilización de microarreglos genómicos.	66
6.6.1.	Cepas seleccionadas	66
6.6.2.	Marcación del ADN genómico.	67
6.6.3.	Hibridación a microarreglos de ADN.	67
6.6.4.	Análisis de los datos obtenidos a partir de los microarreglos	69
6.6.5.	Validación de los datos hallados por microarreglos de ADN.	69
6.6.5.1.	Southern blot	70
6.7.	Análisis bioinformático del genoma completo del genoma de *M. bovis*	72
6.7.1.	Estudio *in vitro* de las secuencias encontradas *in silico.*	72
6.7.2.	Análisis del gen *rpf*A en distintos miembros del Complejo *M. tuberculosis*	73
7.	**Resultados**	74
	PARTE I: Estudio genómico de la Región DR.	74
7.1.	Estudio Genómico de la Región DR en *M. bovis.*	74
7.1.1.	Análisis comparativo de la frecuencia de aparición de espaciadores de *M. bovis.*	74
7.1.2.	Identificación de espaciadores en diferentes aislamientos de *M. bovis*	75
7.1.3.	Análisis de las secuencias realizadas.	79
7.1.4.	Frecuencia de aparición de los nuevos espaciadores	80
7.1.5.	Poder discriminatorio de los nuevos espaciadores en aislamientos de *M. bovis* (spo 34)	81
7.1.6.	Inclusión de los nuevos espaciadores en un spoligotyping de nueva generación.	82
7.1.7.	Determinación del poder discriminatorio de los 104 espaciadores individualmente.	85
7.2.	Estudio genómico *in silico* de la Región DR en micobacterias no pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis.*	87
7.2.1.	Identificación de genes marcadores flanqueantes a la Región DR.	87
7.2.2.	Comparación y análisis de las secuencias comprendidas entre los genes marcadores de las distintas micobacterias.	89
7.2.3.	Confirmación *in vitro* de los resultados obtenidos *in silico*	91

PARTE II: Genómica comparativa en el Complejo *M. tuberculosis* 93

7.3. Comparación de los genomas completos del Complejo *M. tuberculosis* 93
7.3.1. Comparación por microarreglos genómicos. 93
7.3.1.1. Genómica comparativa entre *M. tuberculosis* y *M. microti* 94
7.3.1.2. Caracterización de la región MiD4 en *M. microti* 97
7.3.1.3. *Southern Blot* 98
7.3.2.1. Genómica comparativa de *M. pinnipedii* 99
7.3.2.2. Caracterización de PiD1 y PiD2 en *M. pinnipedii* 103
7.4. Análisis bioinformático del genoma completo de *M. bovis* 107
7.4.1. Análisis *in vitro* de los genes hallados por bioinfomática. 110
7.4.2. Análisis de los polimorfismos presentes en el gen *rpf*A en *M. bovis* 112

8. Discusión 114

9. Conclusiones 133

10. Bibliografía 135

11. Agradecimientos 151

2. ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
cm/cms	Centímetro/s
dNTPs	Dideoxinucleótidos
DR	Repeticiones Directas
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EMB	Etambutol
fg.	Fentogramos
G+C	Contenido de Guanina/Citosina
h./hs.	Hora/Horas
INH	Isoniazida
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido.
IS	Secuencia de Inserción
Kb.	Kilobase
LB	Luria -Berttani
M.	Molar
min.	Minuto
ml.	Mililitro
mM.	Milimolar
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGRS	Secuencias polimórficas ricas en G+C
Pmoles.	Picomoles
PZA	Pirazinamida
RFLP	Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción.
RIF	Rifampicina
Rpm.	Revoluciones por minuto
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TBB	Tuberculosis Bovina
TBC	Tuberculosis
TE	Tris-EDTA
μg	Microgramos
μl	Microlitros
UV	Ultravioleta
V	Volts
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VNTRs	Número variable en la repeticiones en tandem.

Introducción

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. Introducción general a la tuberculosis

La tuberculosis (TBC) es una enfermedad infectocontagiosa, que ha demostrado ser una de las principales causas de muerte en el mundo debido a un patógeno en particular: *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que alrededor de 8,8 millones de nuevos casos ocurren anualmente en el mundo y que 25 millones de personas perderán la vida debido a esta enfermedad en la década corriente (OMS, 2004; Dye *et al*, 1999). La morbilidad y mortalidad producida por TBC alcanzó en el período 1990-1999 cifras de 88 y 30 millones respectivamente (Cosivi *et al*, 1998). El debilitamiento de los programas de control, la epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA) y la aparición de cepas de *M. tuberculosis* multidrogoresistentes (MDR) a los antibióticos de primera línea, han sido la causa del aumento de casos de TBC en la mencionada década.

Por otra parte de acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la tuberculosis produjo la muerte de más de 75.000 personas en Latinoamérica y el Caribe en el año 1995, aproximadamente 400.000 nuevos casos se producen por año, esto significa que cada día cerca de 1.100 personas enferman y más de 200 mueren debido a TBC en nuestra región. La mayoría de los casos se produce en adultos jóvenes en su edad productiva, más de la mitad de los casos estimados ocurren en Brasil, Perú y México. La OPS estima que nueve países poseen severos índices de casos de tuberculosis (más de 85/100.000); estos son: Bolivia, República Dominicana, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, Paraguay y Perú; el resto de los países de la región enfrentan tasas de entre 25/100.000 a 85/100.000 (OPS, 1994).

Si bien la solución al problema de la tuberculosis es de tipo socioeconómico, muchas de estas muertes podrían evitarse de brindarse un mejor acceso al tratamiento y si se contara

con una vacuna más efectiva. En base a la reactividad a la tuberculina, se estima que un tercio de la población mundial esta infectada con *M. tuberculosis* (Dye *et al*, 1999), estos individuos están en riesgo potencial de sufrir la enfermedad posteriormente a lo largo de su vida debido al envejecimiento o una caída en el nivel de su respuesta inmune por ejemplo como resultado de la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Lillebaek *et al*, 2002). La inmunización con *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) BCG (Bacilo de Calmette y Guerin), vacuna utilizada contra la tuberculosis posee una eficacia limitada, especialmente en los países en vías de desarrollo donde la enfermedad tiene sus más altos índices (Fine, 1995).

Hoy en día el tratamiento recomendado por la OMS para la cura de la enfermedad, es el denominado Tratamiento Directamente Observado (TDO) (Espinal *et al*, 1999), que consiste en una combinación de cuatro antibióticos: Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Pirazinamida (PZA) y Etambutol (EMB) los cuales deben suministrarse durante un período mínimo de seis meses, este período tan prolongado, se debe al crecimiento extremadamente lento que presenta el bacilo tuberculoso. El TDO utilizado como estrategia de administración de estos antibióticos ha permitido obtener altas tasas de cura mediante su implementación, pero dicha estrategia sería mucho más efectiva si se pudiera reducir a un período de dos meses, por estas razones la posibilidad de contar con tratamientos menos prolongados y vacunas más efectivas es de vital importancia.

En dirección a la situación anteriormente planteada, es que los estudios genómicos, es decir el análisis detallado de la secuencia genética, abren nuevos caminos en el conocimiento de este patógeno.

3.2. Reseña Histórica de la Tuberculosis.

La Tuberculosis es una enfermedad de antigua data, reconocible en esqueletos de la Edad de Piedra y en momias egipcias y sudamericanas que datan de los 3000-5000 años a.c.

que presentaban síntomas de la enfermedad de Potts, hoy en día una rara manifestación de la tuberculosis que afecta la espina dorsal (Haas y Haas,1996; Salo *et al*, 1994).

Jean Antoine Villemin en el año 1865 estableció la naturaleza infecciosa de la enfermedad, conocida como "tisia", al reproducirla en conejos tras la inoculación de los mismos con material proveniente de lesiones tuberculosas pulmonares y no pulmonares humanas (Bernard *et al*, 1973). Aún antes de estos los trabajos en 1822, surgen las primeras publicaciones sobre la tuberculosis bovina en América del Norte en el "American Farmer", donde se niega la característica contagiosa de la enfermedad. Sin embargo, la investigación de la tuberculosis humana y animal comenzó a partir de 1882, año en que Robert Koch dilucidó la causa de estas lesiones. Koch descubre un bacilo que pudo aislar puro en cultivo, reproduciendo la enfermedad en cobayos y conejos, a partir de los cuales aisló nuevamente en cultivo puro el bacilo al que llamó *Bacterium tuberculosis* (Koch, 1882). En 1896, Lehmann y Neumann proponen incluir los bacilos de tuberculosis y de lepra en el género *Mycobacterium* (Lehmann *et al*, 1896).

Muchos de los miembros del género *Mycobacterium* son organismos que se encuentran en el agua y en el suelo y es razonable suponer que este género tenga sus orígenes en ese ambiente. En 1984, Hayman investigó sobre el hábitat y la distribución geográfica de *M. ulcerans* y concluyó con que este organismo podría haberse establecido en el primitivo continente de Gondwana hace aproximadamente 150 millones de años (Hayman, 1984). Daniel considera que si las conclusiones de Hayman son correctas, esto llevaría a ubicar a este género precediendo el origen de los primates, incluyendo al *Homo sapiens*, y podría haberse diferenciado para incluir al menos una especie moderna ya en aquel momento (Daniel, 2000). Por otra parte se observó que el genoma de *M tuberculosis* tenía una inusual falta de diversidad y una más baja frecuencia de mutación comparado con otras bacterias (Kapur *et al*, 1994), se estima entonces que estas especies se habrían originado en el período comprendido entre 20.000 a 15.000 años atrás.

3.3. Generalidades del género *Mycobacterium sp.*

Las micobacterias pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae,* género *Mycobacterium.* Son bacilos cortos, aerobios, inmóviles, no formadores de esporas, no capsulados, y no flagelados (Kantor, 1998). La propiedad más distintiva de éste género es la que se observa mediante la coloración de Ziehl Nielsen. Se tiñen con dificultad con fucsina, pero una vez que toman el colorante, resisten la decoloración con alcohol ácido, por esta razón se los denomina bacilos ácido-alcoholresistentes (Zinsser,1998).

El género *Mycobacterium* contiene cerca de 60 especies las cuales se dividen en tres grupos principales: las de crecimiento lento, las de crecimiento rápido y especies que no han sido cultivadas *in vitro.* Comprenden un gran grupo taxonómico que incluye especies patógenas, no patógenas y las saprofiticas de origen ambiental o MOTT (*Mycobacteria other than tubercle bacilli*) dado que no producen tuberculosis ni se transmiten entre los hospedadores.

El hábitat más común de la gran mayoría de las micobacterias son el agua y ambientes relacionados. Se encuentran en las superficies de arroyos y estuarios, pero raramente habitan las profundidades, también se las encuentra en suelo y limo, especialmente cuando está enriquecido con materia orgánica; a pesar de que estas bacterias forman parte importante de la flora ambiental, su rol en los procesos relacionados con el medio ambiente se desconoce; algunas micobacterias ambientales causan enfermedades oportunistas en el hombre y animales las mismas incluyen: *Mycobacterium marinum* (*M. marinum*), responsable del granuloma de "swimming pool" en el hombre, y el bacilo de sapo y tortuga *Mycobacterium fortuitum* (*M. fortuitum*) y *Mycobacterium chelonae (M. chelonae*) que ocasionalmente originan una enfermedad pulmonar en el humano.

Las especies *Mycobacterium avium* (*M. avium), Mycobacterium intracellulare* (*M. intracellulare*) y *Mycobacterium silvaticum* (*M. silvaticum*) comprenden el "*M. avium* complex (MAC)". Si bien antes de 1980 estas especies no eran consideradas como

patógenos comunes al hombre y solo producen enfermedad en pacientes con deficiencias congénitas en la inmunidad celular, el VIH transformó a estas micobacterias ambientales en el principal agente infeccioso en personas con SIDA en los países desarrollados (Danborn *et al*, 1993). *M. avium* subsp. *paratuberculosis* o *M. paratuberculosis*, está asociada a la enfermedad de Johne en rumiantes, una gastroenteritis crónica que conlleva grandes pérdidas económicas para la industria pecuaria (Harris y Barletta, 2001). Unos pocos aislamientos de *M. paratuberculosis* fueron obtenidos de pacientes con enfermedad de Crohn, una enfermedad granulomatosa crónica de intestino, pero aún no se ha podido establecer una relación causa-efecto (McFadden y Fidler, 1996).

Mycobacterium leprae (*M. leprae*), causante de la lepra humana, es una de las micobacterias patógenas que todavía hoy no han podido ser cultivadas *in vitro*, lo que constituye un serio problema en la investigación de dicho patógeno, sin embargo en los últimos años se ha descubierto que mamíferos pertenecientes al género *Dasypodidae* (armadillos) no sólo son un excelente modelo animal de estudio de la lepra dada su facilidad para reproducir la enfermedad, sino que se ha encontrado animales naturalmente infectados en Estados Unidos, México y la zona norte de nuestro país (Zumárraga *et al*, 2001). Debido a la imposibilidad de cultivar este bacilo se han desarrollado distintos métodos de tipificación para evaluar la trasmisión de la bacteria, tema que aún no ha podido ser determinado completamente.

Existen siete especies de los denominados bacilos tuberculosos: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae*, *Mycobacterium africanum* (*M. africanum*), *Mycobacterium microti* (*M. microti*), *Mycobacterium canetti* (*M. canetti*) y la recientemente descripta *Mycobacterium pinnipedii* (*M. pinnipedii*), estas especies y subespecies constituyen el denominado Complejo *M. tuberculosis* (van Soolingen *et al*,1997). *M. tuberculosis* es el agente etiológico responsable de la tuberculosis en humanos. Aunque *M. bovis* tiene como hospedador principal al bovino afecta al ser humano

y a un amplio rango de animales domésticos de interés económico como así también animales salvajes. La enfermedad que produce *M. bovis* en el humano es indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*. Las infecciones por *M. bovis* generalmente se transmiten al hombre a través del contacto directo o por consumo de la leche no pasteurizada o productos lácteos de animales infectados. *M. bovis* BCG es una cepa atenuada de *M. bovis* por pasajes seriados a largo de trece años en el laboratorio de Calmette y Guerin y que es utilizada mundialmente como vacuna contra la tuberculosis debido a su atenuación (Calmette, 1927). *M. africanum* ha sido aislada de humanos y monos de Africa (Mac Leod *et al*, 1977; Thoen *et al*, 1980). *M. microti* causa tuberculosis en un ratón campestre europeo denominado "vole" (Boisvert, 1966) si bien recientemente fue aislada de pacientes inmunocomprometidos (van Soolingen *et al*, 1998; Kremer *et al*, 1998). *M. canetti* fue descripta por primera vez en el Instituto Pasteur por George Canetti en 1969 y es una variante lisa muy poco común, que fue aislada de un paciente somalí que sufría de tuberculosis (van Soolingen *et al*, 1997; Pfyffer *et al*, 1998). *M. pinnipedii* sp. nov ha sido recientemente caracterizada como una nueva especie dentro del Complejo, la cual produce tuberculosis en distintas especies de mamíferos marinos pertenecientes a las costas de Australia, Uruguay y Argentina (Cousins *et al*, 1993). Distintos estudios apoyan la hipótesis de que dicho bacilo es un nuevo y único taxón dentro del Complejo *M. tuberculosis* (Romano *et al*, 1995; Alito *et al*, 1999; Zumárraga *et al*, 1999a; Cousins *et al*, 2003). Finalmente *M. bovis* subsp. *caprae* que fue aislada primeramente en cabras en España (Aranaz *et al*, 1999), ha sido elevada a la categoría de especie nueva dentro del Complejo (Niemann *et al*, 2002; Aranaz *et al*, 2003)

3.4. Características generales de las micobacterias.

3.4.1. Estructura de la pared celular.

Las micobacterias son bacilos pequeños, Gram positivos, aeróbicos, cuya característica más importante es su compleja pared celular (Figura 1).

La pared celular esta compuesta de cuatro capas que cubren la membrana celular que, como en las demás bacterias, es una bicapa lipídica. La capa interna de la pared celular esta constituida por péptidoglicanos los cuales están cercanamente relacionados a los encontrados en otras bacterias. Los péptidoglicanos están unidos covalentemente al arabino-galactomanano, polisacárido de arabinosa y galactosa, que constituyen la segunda capa. Las cadenas de arabino-galactomanano son esterificadas a una tercer capa constituida de ácidos micólicos, estos ácidos grasos son largas cadenas con dos brazos que difieren en su largo, uno contiene 50 átomos de carbono y el otro alrededor de 30, el ácido micólico es el principal compuesto de la pared celular y es el responsable de la característica ácido-alcoholresistente que se observa durante la tinción con colorantes arylmetanos tales como la fucsina básica, esto último constituye la base de la coloración de Ziehl Neelsen, método que se emplea para identificar micobacterias al microscopio, este ácido es el que determina la formación del denominado factor cuerda durante el crecimiento *in vitro*. La cuarta capa de la pared celular contiene varios lípidos y compuestos relacionados incluyendo fenolglicolípidos, glicolípidos y péptidos glicolípidos llamados micósidos, los cuales recuerdan los antígenos O de los bacilos gram-negativos.

La resistencia del bacilo al daño celular, a la deshidratación y a ciertos antibióticos sin duda están determinadas por la estructura de su pared celular dado que la misma contiene una gran cantidad de glicolípidos, lipoglicanos y polikétidos como el fenolftiocerol que se acompleja con el ácido micocerósico para conformar el denominado fenolftiocerol-dimicoserosato (PDIM) (Daffé y Draper, 1998), dichos complejos forman una capa

hidrofóbica y es la responsable de la barrera de permeabilidad hacia compuestos hidrofílicos.

Otro importante compuesto de la pared es el lipoarabinomanano (LAM). La porción lipídica se ubica en la membrana celular mientras que los polisacáridos se extienden hacia la superficie de la pared. Probablemente los LAM anclan la pared a la membrana plasmática. Este compuesto es considerado un importante inmunomodulador, tiene un amplio rango de efectos biológicos: Es un poderoso estimulador del factor de necrosis tumoral (TNFα) en macrófagos humanos y de ratón, que resulta en la estimulación de la síntesis de citoquinas tales como GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8. Es también un potente inhibidor de la activación de macrófagos mediada por γ-interferón e inhibidor de la presentación de antígenos por las células presentadoras (Chan *et al*, 1991). La supresión de la proliferación de células T *in vitro* por LAM fue estudiada en *M. tuberculosis* y *M. leprae* (Kaplan *et al*, 1987).

El LAM es también considerado un importante antígeno inductor de respuesta humoral. Además, se ha visto recientemente que *M. tuberculosis* infecta las células dendríticas (DCs) a través de la unión a moléculas intercelulares específicas de adhesión (*DC- specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non integrin*: DC-SIGN). Ese receptor de superficie DC-SIGN tiene la capacidad de discriminar entre las especies micobacterianas a través del reconocimiento selectivo de las moléculas de manosa en el lipoarabinomanano (ManLAM). Debido a eso, las especies saprofíticas de crecimiento rápido tales como: *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis), M. fortuitum, M. chelonae* se unen débilmente a DC-SIGN y las micobacterias de lento crecimiento tales *como M. tuberculosis* y el bacilo de la cepa vacunal *M. bovis* Calmette-Guerin (BCG) lo hacen fuertemente (Maeda *et al*, 2003).

Otro de los componentes sumamente importante de la pared de las micobacterias son las proteínas, las mismas incluyen las proteínas necesarias para la construcción de la pared y las que serán exportadas al medio extracelular. La presencia de Porinas ha sido descripta por

Trias y col. en la pared de *M. chelonae* (Trias *et al*, 1992), estas proteínas pertenecen a la familia de proteínas denominadas OMP (*Outer Membrane Proteins*). En micobacterias las porinas son proteínas que forman un poro en la pared celular que permite el pasaje de ciertos compuestos hidrofílicos. Un trabajo reciente ha descripto la presencia de un marco abierto de lectura en *M. tuberculosis* con homología a la familia de porinas OmpA (Senaratne *et al*, 1998). Por otra parte debido a que *M. tuberculosis* es 10 veces más permeable a distintas moléculas, como por ejemplo la cefalosporina o la estreptomicina, que *M. chelonae* (Connell y Nikaido, 1994), es probable que existan otro tipo de porinas presentes en la pared de esta micobacteria que restringirían el paso de moléculas polares de mayor tamaño al interior de la bacteria.

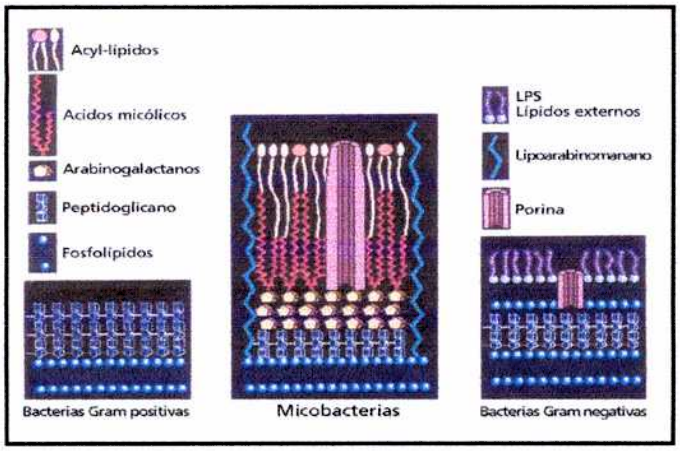


Figura 1. Esquema de la pared de las micobacterias y comparación con otras bacterias.

3.4.2. Replicación

Una manera de clasificar el género *Mycobacterium* es en función de su tasa de crecimiento, que en las micobacterias patógenas se halla alrededor de las 18hs. (Wayne, 1976), esto podría deberse probablemente a las características de la pared, pero estudios comparativos entre *M. tuberculosis*, una micobacteria de crecimiento rápido como *M. smegmatis* y *Escherichia coli (E. coli)*; muestran que la biosíntesis de ácidos nucleicos (replicación y/o transcripción) sería un mejor candidato para la explicación de la tasa tan lenta de crecimiento en *M. tuberculosis.* A pesar de esto, estudios realizados en base a la

cinética de la expresión del gen de la luciferasa sugieren que las diferencias en la transcripción no pueden dar cuenta de la tasa de crecimiento de *M. bovis* BCG que es 10 veces menor a la de *M. smegmatis* (Jacobs *et al*, 1993), esto último parece indicar que la diferencia debe estar relacionada seguramente con la tasa de replicación del ADN que en *M. tuberculosis* es de 3.200 nucleótidos por minuto, es decir 11 veces más lento que en *M. smegmatis*. (Hyriyanna y Ramakrishnan, 1986).

3.5. Patogenicidad

La patogenicidad de *M. tuberculosis* como la de *M. bovis* parece depender de la naturaleza de la respuesta inmune contra el patógeno y de factores propios de la bacteria. Existen distintas alternativas en el proceso de infección; por un lado el bacilo puede ser inmediatamente destruido por la respuesta protectiva innata de manera que nunca se desarrolla la enfermedad. Estos mecanismos son aún desconocidos si bien son el objeto de distintos estudios para desarrollo de vacunas. En segundo lugar una proporción de los individuos infectados puede desarrollar una necrotización de los tejidos y progresión de la enfermedad dentro del período comprendido entre el año y los tres años de sucedida la infección; este grupo carece presumiblemente de los mecanismos necesarios para controlar la infección inicial y desarrollar una respuesta inmune protectiva a tiempo para prevenir la enfermedad; finalmente existe un tercer grupo que se presume como el mayoritario, que presentan una infección clínica latente, esto es tienen reacción positiva a la prueba de la tuberculina, no presentan síntomas clínicos ni son contagiosos para los demás, pero posteriormente puede llegar a desarrollar enfermedad en caso de una reactivación.

El bacilo tuberculoso entra por inhalación al espacio alveolar, donde es ingerido por macrófagos alveolares, la entrada a la célula es mediada por complemento y por el receptor de manosa expresado en la superficie de macrófagos diferenciados, la invasión de macrófagos puede ocurrir a través de la interacción con el receptor de manosa o por

opsonización con C3b, siendo este un mecanismo recientemente descripto donde la entrada a macrófagos de micobacterias patógenas podría estar mediada por complemento. (Schorey *et al*, 1997). El desarrollo o eliminación de la enfermedad depende de la actividad antimicrobiana de los macrófagos y de las citoquinas y factores quimiotácticos secretados por los macrófagos infectados que atraen linfocitos y monocitos desde la sangre, los cuales desarrollan el proceso inflamatorio. Las citoquinas inducen actividad bacteriostática en los macrófagos y aceleran el reclutamiento de linfocitos, a medida que progresa la infección, la multiplicación bacteriana y el reclutamiento de células continua, se agranda la lesión primaria y algunas bacterias son transportadas a la región de los nódulos linfáticos, dando lugar a una reacción granulomatosa. La respuesta inmune genera un proceso inflamatorio con destrucción de tejido, el daño en los tejidos es frecuentemente producido durante una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) a los productos del bacilo causando la necrosis caseosa y la formación de una cavidad. Esta respuesta es el principal mecanismo por el cual el hospedador frena el crecimiento del bacilo en los macrófagos no activados, ya que se genera un medio extracelular desfavorable en el cual la bacteria deja de crecer. En hospedadores que desarrollan una buena respuesta celular adquirida, células T específicas y sus linfoquinas o citoquinas generan la producción de macrófagos activados que ahora sí son capaces de ingerir y destrozar los bacilos, siendo las lesiones encapsuladas, controlándose la infección y no se desarrolla la enfermedad. En cambio si la licuificación del cuerpo caseoso ocurre, los bacilos nuevamente encuentran un medio adecuado para multiplicarse en forma extracelular, que frecuentemente alcanza niveles muy elevados, tal número incrementado de bacterias no puede ser controlado por la respuesta inmune del hospedador y se requiere de agentes terapéuticos para detener la infección, este evento es llamado reactivación endógena de TBC y es frecuentemente inducido por una desregulación de la actividad del hospedador, por ejemplo una inmunosupresión. Asimismo si la licuefacción del cuerpo caseoso alcanza los alvéolos pulmonares, la inflamación provoca tos

lo que produce la trasmisión del bacilo. En hospedadores susceptibles, cuando el bacilo escapa del foco caseoso, son ingeridos por macrófagos inmaduros no activados, donde vuelven a multiplicarse y nuevamente se genera una respuesta inmune con daño tisular. Esto se repite hasta que el tejido pulmonar viable es tan reducido que el hospedador muere.

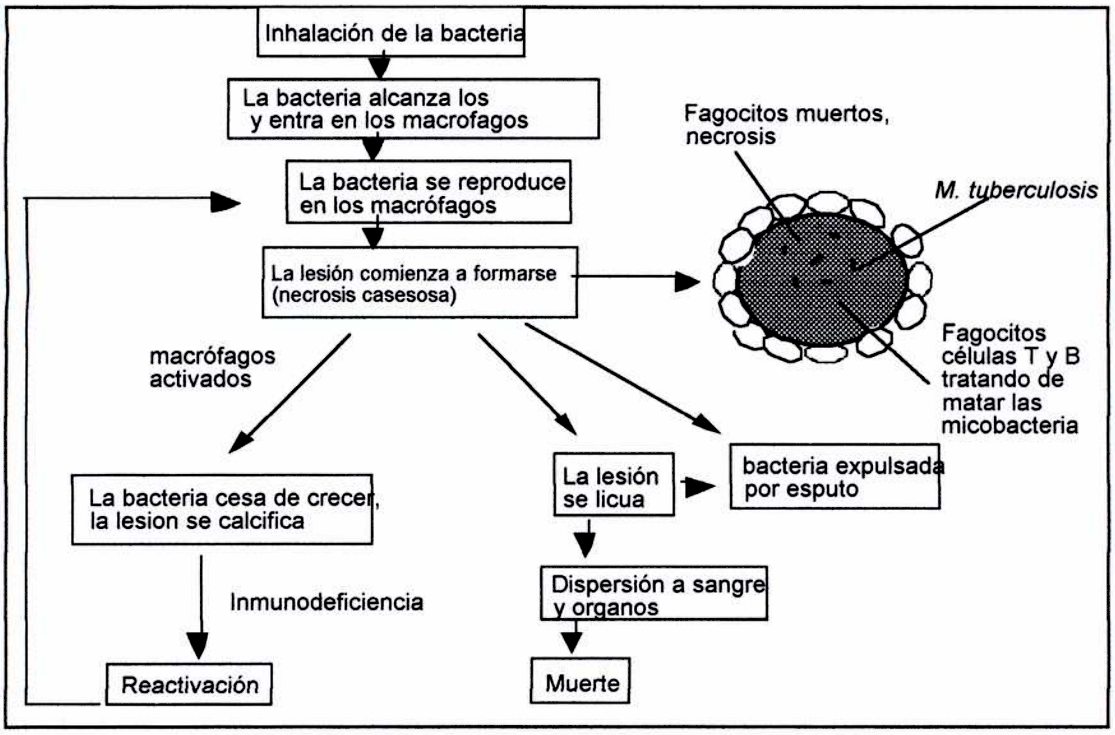


Figura 2. Patogénesis de la tuberculosis

3.6. Respuesta inmune a la tuberculosis

Como se mencionó anteriormente la puerta de entrada de las micobacterias en el hospedador son los macrófagos alveolares, donde la bacteria puede dividirse, ser eliminada o sobrevivir asintomáticamente por muchos años; ocasionalmente en una proporción de personas infectadas y en respuesta a factores aún no dilucidados completamente, esta población de bacilos comienza a dividirse y escapa del macrófago causando la enfermedad.

Cuando una partícula es fagocitada por un macrófago es expuesta a la actividad lisosomal ácida por fusión del fagosoma al lisosoma, los fagosomas son estructuras dinámicas, que una vez formadas, interaccionan con distintas factores de la red endosomal

intercambiando porciones de membrana así como también contenido del lumen (Desjardins *et al*, 1994), la interacción secuencial de los fagosomas con los endosomas tempranos y tardíos culmina con la maduración fagosomal en una organela denominada fagolisosoma. La supervivencia intracelular de algunos patógenos dentro del macrófago tal como las micobacterias, está íntimamente unida a su habilidad de evitar que estas vacuolas se fusionen con los lisosomas. Se cree que las micobacterias han desarrollado mecanismos para evadir la acción del fagolisosoma mediante la inhibición de su formación (Armstrong y Hart, 1971), los mecanismos moleculares de esta inhibición todavía no se conocen, sin embargo, se ha demostrado que la inhibición de la fusión fagolisosomal no es condición necesaria para la supervivencia del bacilo, dado que *M. tuberculosis* opsonizada con anticuerpos sufre la fusión pero permanece viable (Armstrong y Hart, 1975).

Otros autores han demostrado que *M. tuberculosis* pero no así BCG, escapa del fagolisosoma varias horas después de la infección, lo cual brinda antígenos accesibles a la vía endógena de procesamiento (McDonough *et al*, 1993). El modelo fue propuesto para macrófagos murinos y humanos, los autores demuestran que los bacilos pasan rápidamente al fagolisosoma luego de la entrada en el macrófago, pero más tarde aparecen en vacuolas que no se fusionan a lisosomas secundarios y en los que se observa un incremento del número de bacterias, producto de la replicación. Este fenómeno es aún materia de discusión debido a que no pudo ser reproducido por otros autores.

Escapar del fagolisosoma representaría una de las pocas diferencias biológicas entre las cepas virulentas y no virulentas de *M. tuberculosis*; por otro lado, la inmunidad celular promueve la fusión fagolisosomal y el daño de los microorganismos, es decir que el desarrollo o eliminación de la enfermedad depende de la actividad antimicrobiana de los macrófagos.

En contraposición a estos resultados y en concordancia con los de Armstrong y col., un grupo de investigación demostró que *M. tuberculosis* retarda la maduración de su

fagosoma y que la misma reside en un compartimiento con características endosomales y no lisosomales y a diferencia de McDonough, ellos nunca observan bacterias libres en el citoplasma (Clemens y Horwitz, 1995).

Por microscopía electrónica clásica las micobacterias son siempre encontradas rodeadas de estructuras de membranas, además la existencia de vacuolas especiales que las contienen, tanto en el citoplasma de las células fagocíticas, como en el espacio extracelular del pulmón ha sido demostrada en ratones infectados con *M. tuberculosis* (Moreira *et al*, 1997), pero la identificación de células CD8 clase I con reactividad específica hacia las micobacterias plantea la cuestión de como tales antígenos son introducidos en la vía clase I si estas bacterias nunca pasan al citoplasma (Rees *et al*, 1988). Una posible explicación para la presentación de estos antígenos en clase I, es que el bacilo podría escapar de la vacuola y/o que durante su larga persistencia, la vacuola se vuelva permeable y permita la secreción de moléculas de bajo peso molecular que luego entran en clase I, el modelo propone que los antígenos bacterianos son primero procesados en el compartimiento fagocítico y luego los péptidos producidos son regurgitados para unirse en la superficie a moléculas clase I (Pfeifer *et al*, 1993).

3.7. Resistencia a drogas antituberculosas.

Las bacterias utilizan un número considerable de mecanismos de resistencia a drogas que se pueden resumir en cuatro categorías: mecanismos de barrera (disminución de la permeabilidad; bombas de eflujo); enzimas degradativas o inactivantes de drogas (β-lactamasas); modificación de vías involucradas en la activación o metabolismo de las drogas (*kat*G y resistencia a INH) y modificación del blanco de acción de la droga (*inh*A y resistencia a INH). Por otro lado existe un mecanismo transiente de resistencia o no-susceptibilidad cuando la bacteria se encuentra en un estado fisiológico diferente por

ejemplo al entrar en latencia, este mecanismo no responde a bases genéticas y la bacteria se vuelve susceptible al entrar nuevamente en fase de crecimiento activo.

Si bien a lo largo del estudio de los plásmidos y transposones en microbiología, se ha visto que estos codifican para distintos mecanismos de resistencia, no se han encontrado en *M. tuberculosis* tales funciones codificadas en elementos móviles (Martín *et al*, 1990); por el contrario la resistencia en esta bacteria se debe fundamentalmente a mutaciones en el ADN cromosomal. (Heym *et al*, 1994). Asimismo no se ha encontrado que la multirresistencia (definida como resistencia por lo menos a INH y RIF) se deba a una única mutación. Los mecanismos de resistencia a INH, PZA y EMB están presentes sólo en micobacterias (Zhang *et al*, 1992 y 1999), a diferencia de los mecanismos para resistir la acción de la RIF o la estreptomicina que también se encuentran en otras bacterias.

Por otra parte existe la denominada resistencia natural, donde la pared micobacteriana juega un rol fundamental debido a la presencia de distintas bombas de eflujo (Bigi *et al*, 2000) o de transportadores de tipo ABC (*ATP Binding Cassette*) (Silva *et al*, 2001; Wooff *et al*, 2002; Braibant *et al*, 2002).

3.8. Identificación de factores de virulencia en micobacterias

En 1882 Robert Koch publicó una serie de principios para probar la relación entre un microorganismo dado y la enfermedad específica que éste origina. Estos principios se conocen con el nombre de Postulados de Koch. Por otra parte, las técnicas de ADN recombinante han permitido establecer una serie de principios moleculares análogos a los postulados de Koch, conocidos como los "Postulados Moleculares de Koch" (Falkow, 1988). Por ende para determinar si un determinado fenotipo corresponde a un factor de virulencia es necesario: 1) Demostrar que un determinado fenotipo esta siempre presente en una cepa virulenta de un microorganismo dado; 2) Aislar y clonar el gen sospechoso de ser el responsable de dicho fenotipo; 3) Mostrar que la disrupción o alteración de dicho gen

conlleva a una estado de atenuación y 4) Restaurar la virulencia al reintroducir el gen salvaje en la cepa mutante. No siempre se pueden aplicar estos postulados debido a que el proceso de virulencia no necesariamente esta asociado a un único factor y porque en general dicho proceso esta regulado por diferentes genes que a su vez determinan la expresión de otros factores en una cascada regulatoria.

La identificación de factores de virulencia en tuberculosis sufre un importante atraso. Las circunstancias que contribuyeron a esta desventaja son el tiempo de duplicación extremadamente largo y la falta, en las micobacterias patógenas (*M. tuberculosis, M. bovis* y *M. leprae*), de un fenotipo asociado a la virulencia tal como toxinas o factores de adherencia. Solo un 3-7% de las personas infectadas adquieren la enfermedad, la que a su vez, está en gran parte causada por un exacerbación de la respuesta inmune, por lo que es difícil asociar la tuberculosis a un atributo patológico de la bacteria. Por otra parte para poder cumplir con los postulados de Koch mencionados anteriormente fue necesario contar con la posibilidad de transformar micobacterias, metodología que sólo se ha podido lograr, luego de muchos intentos, por primera vez en *M. smegmatis* a través de un vector híbrido que replicaba como plásmido en *E. coli*, pero como fago en micobacterias (Jacobs *et al* 1987); esta técnica alcanzó mayor eficiencia cuando se pudo lograr la introducción de ADN por electroporación de las micobacterias (Snapper *et al*, 1988). Por otro lado la imposibilidad de obtener reemplazo alélico eficiente debido a la baja tasa de recombinación homóloga que presentan las micobacterias, ha llevado también al retraso en la identificación de factores de virulencia (Kalpana *et al*, 1991).

A pesar de las dificultades mencionadas, se han empleado métodos genéticos aplicados a otros patógenos, como la genética reversa, la complementación de cepas naturalmente atenuadas por genes de cepas virulentas (Pascopella *et al*, 1994), la mutagenesis insercional por transposones (Pelicic *et al*, 1997), y por recombinación homóloga (Wilson *et al*, 1997) e intercambio alélico, que han llevado a la identificación de

distintos determinantes de virulencia. La construcción de genotecas sustractivas ha proporcionado un gran aporte a la investigación en tuberculosis por que debido a la implementación de dicha técnica entre una cepa de *M. bovis* salvaje y la cepa *M. bovis* BCG, Mahairas y colaboradores lograron identificar cual era el defecto genético de BCG que causaba su avirulencia. Este grupo pudo identificar tres fragmentos de ADN del genoma de una cepa virulenta *M. bovis* que no se encuentran en la cepa atenuada *M. bovis* BCG Connaught. Uno de estos fragmentos, de 9,5kb y denominado RD1 (Región de Diferencia 1), está deletado en todas las cepas BCG estudiadas, pero conservado en las cepas virulentas de laboratorio y en aislamientos clínicos (Mahairas *et al*, 1996).

Una de la mayores desventajas en la búsqueda de factores de virulencia es sin duda la falta de un fenotipo asociado a algún gen relacionado con la virulencia, que permita identificar fácilmente a la mutante sin necesidad de chequear un alto número de las mismas. Por este motivo es que surgieron distintas técnicas que permiten la selección simultánea de un grupo de mutantes atenuadas para su crecimiento *in vivo*, en distintos genes. Entre estas técnicas se halla la denominada IVET (*In vivo* expresion technology) que permite identificar regiones promotoras para genes que se expresen sólo *in vivo* (Pelicic *et al*, 1998). Una novedosa técnica denominada STM (*Siggnature tagged mutagenesis*) combina la producción de genotecas de mutantes con la identificación directa de mutantes individuales que han perdido alguna propiedad relacionada con la replicación o persistencia *in vivo* (Hensel *et al*, 1995); esta tecnología fue adaptada a mutantes por transposición de *M. tuberculosis* que eran incapaces de replicar en pulmón de ratones y ha llevado a la identificación de mutaciones que afectaban 14 *loci* distintos (Camacho *et al*, 1999), no se observó en estas mutantes diferencia en su crecimiento *in vitro*, sugiriendo que sólo estaban afectadas en el crecimiento *in vivo*. En otro estudio que utilizó STM aplicado a micobacterias, se pudieron aislar mutantes independientes que carecen de la capacidad de sintetizar o transportar el lípido complejo ptiocerol dimicoserato (PDIM) presente sólo en la

pared de las micobacterias patógenas, la síntesis de este complejo es solamente necesaria para la invasión en pulmón, mientras que la capacidad para crecer en hígado y bazo no se vieron afectadas en estas mutantes, lo que demuestra la clara relación de la síntesis de este lípido y la virulencia en *M. tuberculosis.*

Un blanco principal en la búsqueda de determinantes de virulencia es la identificación de aquellos componentes que le permiten a la bacteria evadir y resistir a los mecanismos bactericidas del macrófago y así sobrevivir y multiplicarse dentro del mismo. Para poder responder a agentes tóxicos, las micobacterias poseen una compleja pared con compuestos capaces de neutralizar la acción de radicales libres. Además estas bacterias sintetizan enzimas que le permiten responder a esto intermediarios reactivos: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (*kat*E), la catalasa-peroxidasa (*kat*G) y la alcohol hidroperoxidasa (*Ahp*C). La asociación del gen *kat*G con el fenotipo virulento fue estudiada en cobayos. Wilson y colaboradores (Wilson *et al*, 1995) demostraron en cobayos, una atenuación en la virulencia en cepas de *M. bovis* mutantes para el gen de la catalasa-peroxidasa, la cual era restaurada por complementación con el gen salvaje, sin embargo se han aislado de pacientes tuberculosos, cepas mutantes para el gen *kat*G (asociado a un fenotipo resistente a la isoniazida) que mantiene la virulencia, lo que podría sugerir la existencia de mutaciones compensatorias.

3.9. Tuberculosis Humana en Argentina

La crisis que afectó nuestro país en los últimos años produjo un aumento en los casos de tuberculosis debido principalmente a que llevó al debilitamiento de los programas de control y al incremento de los casos de SIDA, lo que predispone al desarrollo de esta enfermedad. En Argentina se notificaron alrededor de 11.464 casos nuevos de tuberculosis en el año 2001 (30.6 casos/1000.000 hab.), esta cifra representa un descenso de un 2.6% confirmando la tendencia que se viene proyectando desde 1993. (I.N.E.R."Emilio Coni",

2001). La tasa de mortalidad por tuberculosis fue en 2001 de 2.5 cada 100000 hab., pero esta tasa se reduce si no se consideran las muertes asociadas a VIH, dado que se estima que el 8% de los pacientes tuberculosos están coinfectados con VIH (I.N.E.R."Emilio Coni", 2001). En 1998, se notificaron 5330 casos de tuberculosis con residencia en la provincia de Buenos Aires, es decir una tasa de 43.5/100.000 hab. y esta cifra a su vez representa el 43.5% del total de casos notificados en el país. En ese mismo año, los hospitales municipales notificaron 1735 casos de tuberculosis. De estos casos, 805 (46.2%) tenían residencia en la ciudad de Buenos Aires lo que representa una tasa de 26.5 por 100.000 habitantes. Según indican estas cifras la ciudad de Buenos Aires y la provincia homónima concentran casi el 50% de los casos notificados de todo el país (I.N.E.R."Emilio Coni",1998).

3.10. *Mycobacterium bovis*

Mycobacterium bovis causa tuberculosis en un amplio rango de mamíferos incluyendo el hombre (Tabla 1). El ganado bovino es considerado el hospedador primario de este bacilo. *M. bovis* es considerada también un importante patógeno en animales salvajes. Por ejemplo, en el sudoeste de Inglaterra se ha encontrado una alta prevalencia de infección por *M. bovis* en tejones (*Meles meles*) a los cuales se le atribuyó la reinfección de rebaños bovinos (Collins *et al,* 1994). Una asociación similar fue descripta entre una especie de zarigüeya (*Trichonurus vulpecula*) y bovinos de Nueva Zelanda (Morris *et al,* 1994).

Búfalo Africano	*Syncerus caffer*
Mandril	*Papio cynocephalus anubis*
Tejón	*Meles meles*
Bison	*Bisón bisón*
Gatos	*Felis doméstica*
Zarigüeya	*Trichosurus vulpecula*
Alce	*Cervus elaphus*
Ciervo	*Dama dama*
Cabra	*Capra hircus*
Caballo	*Equus sp.*
Antílope	*Kobus lechwe kafuencis*
Cerdos y Jabalíes	*Susscrofa sp.*
Hyrax	*Procavia capensis*

Tabla 1. Especies de animales de las cuales se aisló *M. bovis* (Danborn y Grange, 1993).

3.10.1. *Mycobacterium bovis* en bovinos

M. bovis es el agente causante de la tuberculosis en bovinos. El contagio suele efectuarse por inhalación o ingestión; pero cuando los animales permanecen en establos es más probable la primera ruta. La vía aerógena es la única importante en adultos. Por otra parte, la ingestión es la vía más frecuente de infección cuando los animales permanecen en campos de pastos y contaminan los alimentos y el agua común de bebida. Existe también transmisión vertical de la vaca infectada a su ternero a través de la leche durante el amamantamiento, o congénito a través del cordón umbilical durante la preñez (Neill *et al*, 1994). Como vía menos común cabe citar la infección intrauterina durante el coito, a través de semen infectado y la infección intramamaria por el empleo de sifones de pezón contaminados. Sólo una parte de los animales infectados tiene capacidad para actuar como diseminadores de la enfermedad y en ellos la eliminación se produce en forma intermitente. La capacidad de diseminar la enfermedad no parece estar relacionada con la presencia de lesiones generalizadas, animales infectados con lesiones mínimas pueden ser diseminadores (Morris *et al*, 1994). Neill y col obtuvieron aislamiento positivo a partir de moco nasal de un ternero infectado experimentalmente con una dosis reducida pero no se pudo detectar la presencia del proceso tuberculoso por pruebas inmunológicas ni por la presencia de lesiones (Neill *et al*, 1988).

3.10.2. Tuberculosis Bovina (TBB) en Argentina.

Una encuesta tuberculínica realizada en nuestro país en 1972, arrojó una prevalencia media de esta enfermedad por animal del 4,3%, con un porcentaje de rodeos infectados del 38% (Kantor y Ritacco,1994). Este bacilo causa en el ganado una enfermedad similar a la tuberculosis humana, conduciendo a una baja producción de leche y carne.

Las pérdidas en producción lechera alcanzan al 18% debido a la demora en la aparición de la primera lactancia, disminución de su número en un 10% y reducción de su

duración entre un 5 y un 20% con respecto a los animales sanos. Se agrega a esto, la reducción en la producción del número de litros de leche diarios debido a vacas de ordeñe enfermas, esta reducción afecta también a los denominados subproductos debido a la disminución en la cantidad de grasa obtenida.

A pesar que el hospedador primario es el bovino, otras especies de interés económico, como cerdos o cabras, pueden ser infectados por *M. bovis.* (Martínez-Vivot *et al*, 1997).

En 1983 se comenzó con programas de saneamiento de carácter voluntario en grandes establecimientos ganaderos. Los decomisos por lesiones sospechosas de tuberculosis tuvieron un rango de variación del 6% (1976) y 4,3% (1981), siendo el 5% el promedio de decomiso anual en ese período y actualmente ha disminuido a valores de entre el 1,5 y el 2,5%. En el período 1995-1997, en los frigoríficos con inspección federal se informó que el 1,35% de los animales faenados examinados poseían lesiones macroscópicas compatibles con lesiones tuberculosas (Torres *et al*, 1997).

A partir de marzo de 1999 se aprobó la resolución Nro 115/99 la cual establece que el "Programa Nacional de Lucha contra la Tuberculosis Bovina" implemente el control y erradicación de la enfermedad mediante el saneamiento realizado por productores y médicos veterinarios acreditados.

3.10.3. *Mycobacterium bovis* en humanos

M. bovis es transmitida del ganado al humano por vía aerógena e indirectamente por su consumo en la leche y derivados lácteos, esto último fue una fuente importante de transmisión en los países industrializados en la primera década del siglo pasado. La pasteurización de la leche junto con los programas de erradicación de la tuberculosis bovina ha reducido drásticamente la incidencia de tuberculosis humana debido a *M. bovis* en estos países desarrollados.

No está claro si la progresión de la enfermedad ocurre como en el caso de *M. tuberculosis*, pero estudios epidemiológicos en personas infectadas con *M. bovis* demuestran que estos tienen menos probabilidad de desarrollar una segunda infección que los infectados con *M. tuberculosis* (Magnus, 1966). Históricamente, los pacientes infectados con *M. bovis* desarrollaban tuberculosis extrapulmonares, siendo los niños los más afectados. La localización extrapulmonar (adenitis cervical, digestiva, infecciones genitourinarias, tuberculosis ósea, y articular y las meningitis) del bacilo bovino no se debe a su afinidad con otros tejidos, sino a su modo de transmisión más común, por ingestión de leche o productos lácteos crudos. La tuberculosis pulmonar es ocasionada por transmisión aerógena, las principales vías de exposición actuales son: los aerosoles en galpones o al aire libre a partir de la tos del ganado enfermo.

La enfermedad primaria en humanos debida a *M. bovis* es muy rara en países desarrollados donde la tuberculosis bovina ha sido erradicada, pero se han informado casos de reactivación o infección post-primaria en personas nacidas antes de que los esquemas de erradicación fueran completados. Existen muy pocos casos de transmisión entre humanos de *M. bovis*, si bien se han confirmado casos en personas infectadas con VIH (Bouvet *et al*, 1993; Grange y Danborn, 1994), donde la transmisión intrahospitalaria de *M.bovis* multirresistente ha sido demostrada en Europa (Samper *et al*, 1997).

El porcentaje de tuberculosis en humanos debido a *M. bovis* en la República Argentina varía entre el 0,4 y 6,2% de las tuberculosis totales, siendo la mayoría de las personas infectadas empleados de frigoríficos y trabajadores rurales. La provincia de Santa Fe, en la cual se realizan estudios sistemáticos de los aislamientos de micobacterias en humanos para su tipificación, es la que presenta la prevalencia más elevada, con un promedio de 2,4% de TBB en el total de las tuberculosis en los últimos 15 años. Un estudio realizado en dicha provincia indicó que durante el período 1984-1989, *M. bovis* fue

responsable de 2.4 a 6.2% de los casos de tuberculosis en humanos, donde el 64% de los pacientes, fueron trabajadores rurales y de frigorífico (Latini *et al*, 1990).

Existe muy escasa información epidemiológica del impacto de esta zoonosis en la Salud Pública, principalmente debido a que el diagnóstico de tuberculosis en Latino América esta generalmente limitado al examen directo por medio de la microscopía que no permite distinguir entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Para un estudio correcto de la ocurrencia de tuberculosis humana debida a *M. bovis* es necesario contar con una metodología sencilla y rápida que permita diferenciar *M. bovis* del resto de las micobacterias del Complejo *M. tuberculosis*. El cultivo diferencial es una herramienta muy importante para identificar y clasificar las micobacterias de crecimiento lento, pero cuenta con el inconveniente de que se requiere de largos períodos de tiempo para obtener el resultado; por otro lado, la PCR (*Polimerase Chain Reaction*) y técnicas relacionadas para la detección directa de ácidos nucleicos se están aplicando para identificación, pero aún presentan problemas de sensibilidad, especificidad y contaminación. La falta de un método preciso de especiación dentro del Complejo *M. tuberculosis* ha llevado a numerosos grupos a la búsqueda de métodos moleculares que permitan distinguir *M. bovis* de *M. tuberculosis* (Del Portillo *et al*, 1991; Rodriguez *et al*, 1995; Fisanotti *et al*, 1997, Parsons *et al*, 2002).

Un factor a tener en cuenta en la epidemiología de la tuberculosis debida a *M. bovis* es la pandemia del VIH, la cual favorece la transmisión entre humanos (Grange y Danborn, 1994). Casos de tuberculosis en enfermos de SIDA debido a *M. bovis* han sido informados en EEUU y México (Dankner *et al*, 1993), como también en España (Blázquez *et al*, 1997).

3.11. Epidemiología

La progresión de una enfermedad en un individuo y la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas es el objeto de estudio de la investigación clínica. La epidemiología complementa este enfoque y busca estudiar la ocurrencia y posibilidad de

aparición de una enfermedad infecciosa dentro de una población con el objeto de encontrar la forma de prevenirla. En este punto es importante distinguir entre infección y enfermedad, debido a que la segunda puede representar la punta del iceberg respecto de los individuos infectados en una población dada, a esto se le suma que los factores que influyen en el riesgo de la infección pueden o no ser los mismos que determinen la adquisición de los síntomas clínicos o que la infección curse de manera asintomática. Este es el caso particular en tuberculosis, dado que la bacteria evoluciona paralelamente a su hospedador generando la posibilidad que solo en una pequeña proporción de la población infectada la enfermedad progrese a la manifestación clínica (Smith y Moss, 1994).

3.11.1. Epidemiología molecular en micobacterias.

En microbiología, la epidemiología se ha enriquecido por el uso de técnicas de biología molecular como por ejemplo la genotipificación de ADN, que se basan en tipificar cepas bacterianas en función de sus características genéticas; esta especialidad se denomina Epidemiología Molecular e implica la integración de las mencionadas técnicas moleculares para rastrear cepas específicas del patógeno, que junto al enfoque de la epidemiología convencional permiten entender la distribución de la enfermedad en la población y de esta manera racionalizar los métodos utilizados en los programas de control.

En los primeros años de desarrollo de esta herramienta para el estudio de la epidemiología de la TBC, se utilizó la denominada REA (*Restriction Endonuclease Analysis*) donde el ADN cromosómico es digerido por enzimas de restricción particulares sembrado en un gel de agarosa y analizado a simple vista (Collins *et al*, 1985); más tarde distintos elementos repetitivos de ADN se clonaron para ser utilizados como sondas para visualizar solo aquellos fragmentos de restricción que contengan secuencias complementarias a las mismas, esta técnica se denomina Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

El método más comúnmente aplicado para la tipificación de aislamientos del Complejo *M. tuberculosis* es sin duda el uso de la secuencia de inserción IS*6110* como sonda en ensayos de RFLP (Thierry *et al*, 1990); este método se basa en la diferencia entre las cepas en la posición que ocupa la secuencia de inserción a lo largo del cromosoma y en la variabilidad en el número de copias de esta secuencia de inserción, que oscilan entre 0 y 25; este polimorfismo genético y su estabilidad en el cromosoma, prueban que IS*6110* puede ser aplicable a estudios epidemiológicos (van Soolingen y Hermans, 1995). IS*6110* ha sido especialmente útil en tuberculosis humana para identificar brotes, como por ejemplo trasmisión clonal en ambientes reducidos como prisiones, hospitales e incluso dentro de los hogares (Hermans *et al*, 1995; CDC, 1991 y 1992; Fischl *et al*, 1992); asimismo la implementación de la genotipificación mediante el uso de IS*6110* en grandes zonas geográficas ha permitido rastrear la transmisión de tuberculosis y en algunos casos identificar el denominado "caso índice", como también particularmente en tuberculosis humana ha contribuido a la identificación de distintas familias de genotipos responsables de brotes de TBC, como por ejemplo las denominadas Familias "Beijing", "Manila" o "Harlem" (van Soolingen *et al*, 1995; Hermans *et al*, 1995; Grimaldo *et al*, 2001; Glynn *et al*, 2002; Douglas *et al*, 2003). Otro aporte de suma importancia ha sido la capacidad de diferenciar entre reinfección y reactivación que presumiblemente se asocia a una reactivación endógena debido a fallas en el sistema inmunológico o a fallas en el tratamiento (Small *et al*, 1993). A su vez se ha implementado esta técnica para la vigilancia epidemiológica en grupos de riesgo por ejemplo los drogodependientes, las personas infectadas con VIH, o los individuos que viven en la calle (Small *et al*, 1994). Por otra parte IS*6110* ha tenido un aporte invaluable en la investigación de las denominadas tuberculosis MDR, donde se ha demostrado una gran diversidad entre este tipo de cepas de *M. tuberculosis*, lo que sugiere un incremento de dicho tipo de TBC implicando nuevamente una falla en el tratamiento (Pearson *et al*, 1992).

La aplicación de esta metodología ha contribuido así mismo a la identificación de especies particulares dentro del complejo *M. tuberculosis* como por ejemplo el caso de *M. canetti* (van Soolingen *et al*, 1997). Desafortunadamente en *M. bovis* la utilidad de IS*6110* es menor debido a que existen una o muy pocas copias en el cromosoma de esta bacteria lo que no permite obtener un poder discriminatorio suficiente (van Soolingen *et al*, 1994, Romano *et al*, 1996). Por este motivo se ha decidido aplicar otros métodos de tipificación en aquellos aislamientos pertenecientes al Complejo *M.tuberculosis* que presenten cinco o menos copias de la secuencia IS*6110*; entre ellos se encuentran el uso de la sonda PGRS (*Polymorphic GC-rich sequence*), esta es una secuencia corta presente en múltiples agrupamientos a lo largo del cromosoma que esta compuesta por repeticiones no conservadas ricas en Guanosina y Citosina. La misma se usa también como sonda en ensayos de RFLP y tiene una mayor resolución en aislamientos pertenecientes a *M. bovis* que el uso de IS*6110* (van Soolingen *et al*, 1994).

En los últimos años se han descrito distintas técnicas de genotipificación basadas en la amplificación por PCR, esta técnica tiene como ventaja que solo es necesaria una cantidad muy pequeña de bacterias para la tipificación, debido a que solo es necesario unos pocos nanogramos de ADN para obtener un resultado confiable, además de ser un método muy sencillo de aplicar en cualquier laboratorio y que ha permitido distinguir por ejemplo entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*. El mayor poder discriminatorio se ha conseguido hoy en día al analizar los polimorfismos de los denominados VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*); MIRU (*Mycobacterial interspersed repetitive unit*), y con la aplicación de las técnicas denominadas FAFLP (*fluorescent amplified-fragment length polymorphism*) y Spoligotyping (*Spacer oligonucleotide typing*) (Kremer *et al*, 1999). Los VNTRs implican amplificación por PCR de repeticiones múltiples en tandem donde el tamaño del producto obtenido es analizado en geles de agarosa o en mediante un secuenciador automático utilizando un producto marcado con fluorescencia (Frothingham *et al*, 1998). Los MIRU

son VNTRs por lo tanto tiene un fundamento similar, basado en el número de copias de repeticiones directas. Los MIRU se encuentran distribuidos a lo largo del genoma de las micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*; y han sido identificados hasta hoy 41 MIRU y se observó que 12 de ellos son polimórficos, mostrando variación en el número de copias de las repeticiones directas e incluso en la secuencia nucleotídica de cada uno (Supply *et al*, 2000). La técnica de FAFLP visualiza sustituciones de bases nucleotídicas a través del genoma completo mediante la marcación de productos de restricción con distintos colorantes fluorescentes por base nucleotídica, que son analizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida mediante un secuenciador automático. En algunos aislamientos particulares, los patrones FAFLP han sido de mayor poder discrimatorio que los patrones de RFLP/IS*6110* (Goulding *et al*, 2000).

Por otra parte una secuencia blanco de amplificación por PCR utilizada para la diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, ha sido una secuencia flanqueante al gen *mpb*64. Esta es una secuencia caracterizada en nuestro laboratorio denominada "12.7" dado que comprende 12.7kb. ausentes en *M. bovis* (Fisanotti *et al*, 1997; Zumárraga *et al*, 1999c).

3.11.2. Spoligotyping.

Si bien los métodos mencionados hasta el momento han sido de suma utilidad para la tipificación y caracterización de distintos aislamientos del Complejo *M. tuberculosis*, una de las técnicas también basadas en amplificación por PCR, de mayor uso en la epidemiología molecular de las micobacterias ha sido el denominado Spoligotyping por *Sp* (espaciador) *Oligo* (oligonucleótido) *Typing* (Tipificación) (Kamerbeek *et al*, 1997), el mismo fundamenta su origen en el polimorfismo hallado en un único *locus* del genoma de las micobacterias pertenecientes al Complejo denominado Región DR por *Direct Repeat* (Repeticiones Directas) (Hermans *et al*, 1991). La región DR recientemente denominada CRISPR (*Clustered regurlarly interspaced short palindromic repeats*, Jansen *et al*, 2002),

consiste en secuencias repetitivas de 36pb, las cuales se encuentran separadas por un número variable de secuencias no repetitivas con alto grado de polimorfismo denominadas espaciadores, cuya longitud oscila entre las 27 y 41pb. Los espaciadores son de secuencias variables y se ha establecido que cada espaciador particular, generalmente se halla una sola vez en la región DR; en el caso en que se encuentren repetidos, pueden estar contiguos o separados por uno o más DR y otros espaciadores. El orden en que se encuentran dispuestos los espaciadores generalmente es el mismo en todas las micobacterias que integran el Complejo *M. tuberculosis*. Debido a que en esta región ocurren deleciones e inserciones que cambian la cantidad de espaciadores presentes en cada cepa, esto es utilizado para la tipificación de las mismas (Bunschoten *et al*, 1996).

El spoligotyping se ha desarrollado ha partir de dicho polimorfismo y consiste en una primera etapa de amplificación por PCR de la Región DR utilizando dos oligonucleótidos iniciadores (uno de ellos biotinilado para posterior revelado) de 18 nucleótidos cada uno. La secuencia blanco de los oligonucleótidos iniciadores son las repeticiones directas de secuencia constante; esto permite amplificar la zona que se encuentra entre ellos y dado que el número de copias de repeticiones directas que actuarán como secuencias blanco es alto, la PCR será altamente sensible. La segunda etapa se basa en la detección de los productos amplificados. Esto se realiza con una hibridación reversa de los productos amplificados, a las secuencias de los espaciadores que se encuentran fijados covalentemente como líneas delgadas a una membrana de nylon; de forma tal que al haber homología dará lugar a un punto de hibridación. Este tipo de técnica de hibridación se conoce como *Line Probe Assay*. Esta membrana contiene 43 espaciadores de secuencia conocida, las cuales fueron obtenidas por secuenciación de la región DR completa de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y de la secuencia parcial de dicha región de la cepa *M. bovis* BCG. Los productos que no hibridan se eliminan con sucesivos lavados y los que si lo hacen se detectan con el sistema estreptavidina-peroxidasa que se une a la biotina

presente en los productos amplificados; luego la membrana se incuba con luminol, de tal manera que la peroxidasa catalizará la oxidación del reactivo dando como resultado la emisión de luz, la cual será detectada por exposición de la membrana a un film de radiografía. Para la siembra de las muestras de amplificación se utiliza un dispositivo de acrílico que separa las muestras en calles perpendiculares a las líneas de los espaciadores. Esta es una técnica de las denominadas de Hibridización reversa.

Esta novedosa técnica ha permitido tipificar a las micobacterias del Complejo a partir de muestras clínicas sin necesidad de cultivo, describiéndose "spoligotipos" característicos de cada cepa, permitiendo especialmente la rápida diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* debido a que en *M. bovis* se observa un spoligotipo característico donde están ausentes los espaciadores 39 al 43 (Figura 3). El grado de diferenciación de las cepas por Spoligotyping es óptimo para cepas con bajo número de copias de IS*6110* por genoma, tal es el caso de *M. bovis* (van Soolingen *et al*, 1997; Fisanotti *et al*, 1997), en cambio para cepas con alto número de copias de este elemento, como *M. tuberculosis*, no se logran mejores resultados que los obtenidos por RFLP; esto implica que para una mejor diferenciación de cepas de *M. tuberculosis* que presentan el mismo spoligotipo, es necesario realizar también RFLP con IS*6110* como sonda. La secuencia IS*6110* se encuentra en la mayoría de los casos, entre los espaciadores número 25 y 26 de la Región DR.

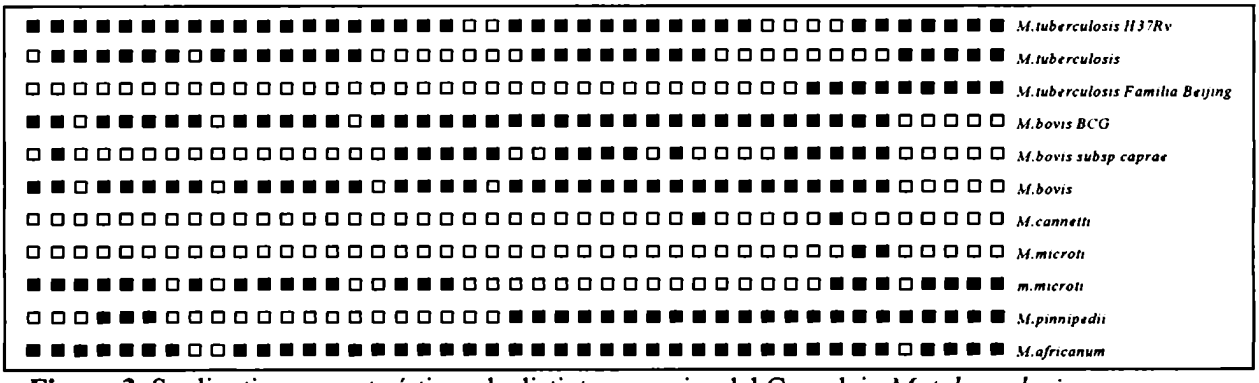


Figura 3. Spoligotipos característicos de distintas especies del Complejo *M. tuberculosis*

3.11.3. Spoligotyping en *M. bovis.*

Como se mencionó anteriormente, *M. bovis* presenta un bajo número de copias de IS*6110* en su genoma, en particular en Argentina el 82% de los aislamientos de *M. bovis* estudiados tienen una única copia (Romano *et al,*1996); motivo por el cual el spoligotyping resulta un método eficiente para su diferenciación, tipificación e incluso la asignación de patrones específicos a zonas geográficas-ganaderas determinadas, de esta manera es posible identificar zonas de inicio de rebrotes, tarea específica de la epidemiología (Latini *et al*, 1990; Abdala *et al*, 1997; Zumárraga *et al*,1999b).

Dado que el spoligotyping es una técnica rápida y de fácil aplicación, es de suma importancia su perfeccionamiento; el mismo apunta a aumentar el grado de diferenciación de las cepas, en particular de *M. bovis*; por este motivo la inclusión de nuevas secuencias de espaciadores específicos de *M. bovis* a la membrana de spoligotyping, permitirían incrementar el poder discriminatorio de esta técnica.

3.12. Genómica en *M. tuberculosis*

La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al*, 1998) y su detallado análisis informático ha provisto a la investigación en tuberculosis con una nueva y amplia fuente de información, conocimiento y entendimiento de la biología de este importante patógeno.

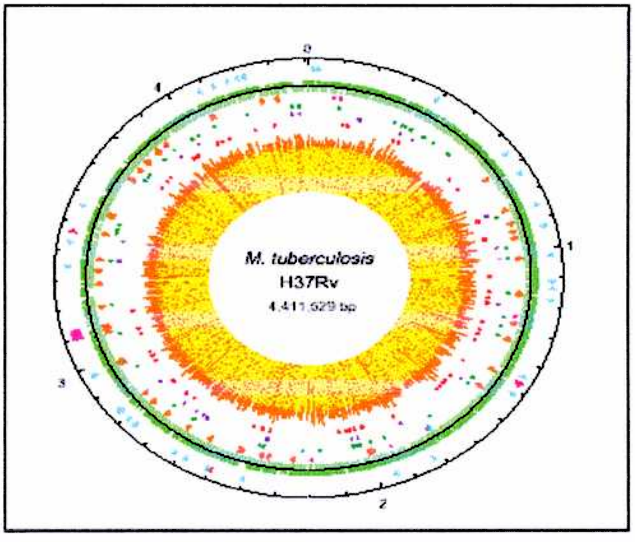


Figura 4. Esquema del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv

La secuenciación del genoma fue realizada a partir de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv (Steenken y Gardner, 1946), que si bien ha sufrido diferentes pasajes en el laboratorio, ha mantenido su virulencia desde el momento de su aislamiento en 1905.

Para obtener la secuencia completa se utilizó un enfoque combinado entre el uso de insertos de gran tamaño clonados en cósmidos y BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) tanto como el uso de clones con insertos de bajo peso molecular utilizados para completar zonas faltantes de la secuencia. La secuencia completa de *M. tuberculosis* H37Rv comprende 4.411.532 pb. Tiene un contenido de G+C de 65%.que se mantiene constante a lo largo del genoma indicando que la transferencia horizontal de islas de patogenicidad de contenido de G+C diferente, ha sido poco probable. Contiene un total de 3974 genes distribuidos de manera equitativa entre las dos cadenas de ADN que dan cuenta de más de un 91% de su capacidad codificante. Los genes fueron numerados a partir del codon de iniciación del gen *dna*A y clasificados en 11 grupos funcionales y denominados con el prefijo "Rv" haciendo referencia a la cepa a partir de la cual se obtuvo la secuencia. Hasta el día de hoy se le han atribuido una función putativa a 2058 proteínas esto es el 52% de los 3994 predichos, siendo el 48% restante de función desconocida o hipotética de acuerdo a la reanotación que se realizó del genoma en el año 2002 (Camus *et al*, 2002). Tabla 2.

Clase	Funciones	Nro de genes reanotados	Nro de genes (1998)	Nro de genes (2002)	% del total (2002)
0	Virulencia,Adaptación,Detoxificación	1	91	99	2.4
1	Metabolismo de Lípidos	1	225	233	5.8
2	Rutas de información	3	207	229	5.7
3	Pared celular y su procesamiento	11	516	708	17.7
4	ARNs estables	0	50	50	1.25
5	Secuencias de inserción y profagos	6	137	149	3.7
6	Proteínas PE y PPE	2	167	170	4.2
7	Intermediarios de metabolismo y respiración	6	877	894	22.3
8	Proteínas de función desconocida	14	606	272	6.8
9	Proteínas regulatorias	3	188	189	4.7
10	Proteínas conservadas	35	910	1051	26.3

Tabla 2: Clasificación funcional de los genes de *M. tuberculosis* H37Rv. Comparación entre la anotación en 1998 y el 2002.

El 8% del genoma está dedicado a la síntesis de lípidos dado que la pared de este bacilo contiene una gran cantidad de glicolípidos, lipoglicanos y polikétidos (Daffé y Draper, 1998). Asimismo se han encontrado una numerosa cantidad de enzimas (alrededor de 100), involucradas en la degradación de estos compuestos (Wheeler y Ratledge, 1994). Esta cantidad de factores relacionados con la lipólisis no se ha observado aún en otras bacterias. Aunque la presencia de una red completa de sistemas anabólicos esta de acuerdo con la noción de que el bacilo tuberculoso ha emergido recientemente como un patógeno humano, y por ende ha tenido poco tiempo para adaptarse al nuevo hospedador mediante la adquisición de nuevos genes biosintéticos, esto también podría indicar que la disponibilidad de precursores metabólicos está limitada dentro del fagosoma (Cole, 2002). Esta última teoría se apoya en la explicación provista por el hallazgo de genes que codifican para funciones anabólicas en el genoma de *M. leprae* un patógeno intracelular obligado sumamente relacionado a *M. tuberculosis* (Cole *et al*, 2001; Eiglmeier et al, 2001).

Por otra parte existen en los genomas bacterianos dos formas de ADN repetitivo, repeticiones en tandem y repeticiones dispersas a lo largo del cromosoma. Las repeticiones dispersas podrían corresponder a genes duplicados o a elementos genéticos móviles como las secuencias de inserción (IS). Entre un 3 y 4% del genoma de *M. tuberculosis* codifica para secuencias de inserción y profagos. Se han encontrado al día de la fecha en *M. tuberculosis*, 56 elementos IS intactos y truncados que pertenecen las familias IS3, IS5, IS21, IS30, IS110, IS256, ISL3 y IS1535. La movilidad potencial de las secuencias de inserción constituye la principal fuente de plasticidad del genoma y es muy probable que sean la causa de distintos rearreglos genómicos tanto como de inserciones y deleciones (Mahillion y Chandler,1998). La secuencia IS*6110* es la más conocida y ha jugado un rol importantísimo en la mencionada plasticidad del genoma. Como se mencionó anteriormente esta secuencia ha sido de gran aplicación en distintos métodos de tipificación debido a su alta variabilidad en el número de copias que presentan los diferentes aislamientos. A su vez

por medio del análisis *in silico* del genoma se ha podido observar que la IS*6110* es responsable de distintos eventos de deleciones (Brosch *et al*, 1999). Forbes y col. han observado dichos eventos en cepas obtenidas a partir de aislamientos humanos, indicando que la variabilidad genómica mediada por IS*6110* también ocurre durante el proceso de infección natural (Fang *et al*, 1998 y 1999). Un tipo nuevo de repeticiones mencionado anteriormente fue descripto por Supply y col., quienes le dieron el nombre de MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*), se han clasificado en tres clases, 1 a III de acuerdo a la secuencia, organización y rango de tamaño que oscila entre las 46 y 101pb. Estas repeticiones aparecen alrededor de 64 veces a lo largo del cromosoma de *M. tuberculosis* y ocupan 41 *loci*. La mayoría de ellos son intergénicos y contienen un marco abierto de lectura muy corto, cuyo codon de terminación o de iniciación se superponen con alguno de los genes flanqueantes. Debido a que cada MIRU contiene repeticiones en tandem tienen el poder potencial de presentar polimorfismos a través del cambio en el número de copias, lo que ha llevado al desarrollo de una técnica para la tipificación de cepas (Magdalena *et al*, 1998). La resolución de este método de tipificación es superior a aquellos basados en IS*6110* o en las repeticiones directas.

3.12.1. Familia de proteínas PE y PPE.

Uno de los hallazgos más importantes de la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* ha sido la identificación de una gran familia de genes poco conocidas hasta el momento. La familia de las proteínas PE y de las PPE que ocupan el 8% del genoma y comprenden 100 y 70 genes respectivamente (Cole y Barrell, 1998; Camus *et al*, 2002). Los miembros de cada una de estas dos familias comparten un dominio N-terminal conservado de alrededor de 110 a 180 aminoácidos, el cual se caracteriza por un motivo Prolina-Glutamato (PE en el código de una letra) o Prolina-Prolina-Glutamato (PPE) en las posiciones 8-9 ó 8-10 respectivamente. A la primera familia pertenecen las proteínas

denominadas PGRS (Secuencia Polimórfica rica en GC) (Poluet y Cole, 1995) y a la segunda pertenecen las proteínas de la clase MPTR (*Major polimorfic tandem repeat*). Las proteínas PGRS codifican el motivo AsnGlyGlyAlaGlyGlyAla, mientras que las MPTR llevan el motivo AsnXGlyXGlyAsnXGly. Inicialmente se pensó que las PGRS y las MPTR correspondían a repeticiones en tandem o microsatélites dispersos, pero el hallazgo de que forman parte de regiones codificantes hizo cambiar la idea acerca de la función de dichas secuencias; a partir de distintos estudios creció la evidencia a favor de que las PE-PGRS estarían también involucradas en procesos de patogenia (Camacho *et al*, 1999). Además algunos miembros de la familia PGRS estarían implicados en la patogénesis en *M. marinum* donde al menos dos genes se ven fuertemente sobreexpresados luego de la fagocitosis de la bacteria. (Ramakrishnan *et al*, 2000). Mediante fraccionamiento subcelular, anticuerpos teñidos con fluoróforos, se ha ubicado a las PGRS en la pared celular y en la membrana de *M. tuberculosis* (Banu *et al*, 2002); por otro lado existe poca evidencia de la posible función de las proteínas de la familia MPTR, pero uno de los miembros ha sido visto como asociado a la pared celular y expuesto a la superficie (Sampson *et al*, 2001), estas evidencias sugieren que ambas familias corresponderían a antígenos de superficie (Banu *et al*, 2002).

3.12.2. Familia de proteínas ESAT.

La familia de proteínas ESAT (*Early Secreted Antigen T*) es una familia de potentes antígenos con epítopes T. Se secretan al medio extracelular de una manera independiente de péptido señal, y son los antígenos que se encuentran en mayor concentración en un medio de cultivo de fase exponencial temprana (Sorensen *et al*, 1995). A partir de la secuenciación del genoma y el análisis *in silico* del proteoma, se observó que esta familia está constituida por 14 miembros que presentan un rango de peso molecular de 90 a 120 aminoácidos y que existen dos tipos de organización en estas proteínas. En el caso más simple, el gen que codifica para una proteína ESAT se ubica río abajo de una proteína PE o PPE, el segundo

tipo de arreglo ubica cuatro genes ESAT río abajo de genes que codifican para proteínas transmembrana con sitio de unión a ATP y a su vez río abajo de la proteína ESAT se observa la presencia de proteínas de membrana que incluyen Serina-proteasas. La conservación que presentan éstas proteínas indicaría que habrían surgido como resultado de duplicaciones génicas y que todo el locus codificaría para el aparato secretorio de la familia ESAT (Tekaia *et al*, 1999). Recientemente Berthet y col, han demostrado que los genes *esx*, que codifican para las proteínas de ésta familia, son parte de una unidad transcripcional que contiene otro miembro de la familia denominado *lhp*. La proteína Lph o CFP10 (*culture filtrate protein 10*) se encontró en el sobrenadante de cultivo asociada a ESAT6, lo que sugiere nuevamente una compleja maquinaria secretoria (Berthet *et al*, 1998).

Como se mencionó previamente las proteínas ESAT-6 son potentes antígenos T (Skjot *et al*, 2000) pero su función en la patogénesis de la tuberculosis aún no está definida. Se investigó la potencialidad diagnóstica de estos antígenos en animales experimentalmente infectados con *M. bovis* así como también en humanos y ganado naturalmente infectado y se encontró que la combinación de ESAT-6 y CFP10 era altamente sensible y específica para el diagnóstico tanto *in vivo* como *in vitro*. En humanos, la combinación de ambos antígenos en un test de dosaje de gINF, proporcionó una sensibilidad del 73% y una especificidad del 93% mientras que la especificidad obtenida por PPD fue del 7% (Van Pinxteren *et al*, 2000).

3.13. Genómica de *M. bovis*

En los últimos años se han obtenido muy pocos resultados desde la investigación en lo referente a la tuberculosis animal, en contraste con el paulatino aumento de esta enfermedad. *M. bovis* es un patógeno que provoca problemas sanitarios debido a que afecta no solo a los animales domésticos o el ganado, sino también a los reservorios de vida salvaje con serias implicancias para la biodiversidad e incluso para el control de la enfermedad (Krebs, 1997; Weyer *et al*, 1999). Por este motivo la disponibilidad del genoma de *M. bovis*

ha sentado las bases genéticas, para responder a caracteres fenotípicos propios de este bacilo.

El genoma fue completamente secuenciado a partir de un aislamiento virulento (*M. bovis* AF2122/97) proveniente de Gran Bretaña obtenido a partir de una vaca tuberculosa en 1997 (Garnier *et al*, 2003), comprende 4.345.462pb., siendo 66kb. más pequeño que el genoma de *M. tuberculosis* (Philipp *et at*, 1996). El genoma posee un contenido de G+C de 65.63% y codifica para alrededor de 3952 genes que incluyen profagos y 42 secuencias de inserción. *M. bovis* comparte alrededor del 99% de identidad de secuencia a nivel de ADN con *M. tuberculosis* y no presenta evidencia de grandes translocaciones, duplicaciones o inversiones siendo la fuerza preponderante que moldeó este genoma, la presencia de deleciones. Tampoco existen genes únicos de *M. bovis* respecto de los otros miembros del Complejo (Garnier *et al*, 2003). A pesar de ello, *M. bovis* puede diferenciarse fácilmente respecto a los demás miembros por su amplio rango de hospedador dado que causa enfermedad en animales tan diversos como los bovinos, perros, gatos, e inclusive el hombre.

Las principales diferencias génicas entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*, se deben a genes que codifican factores relacionados con la pared celular y con proteínas secretadas, entre estas diferencias se encuentran los genes codificantes para las lipoproteínas LppO, LpqT, LpqG y LprM que se encuentran deletados en *M. bovis* como el gen *rpf*A que codifica para un factor que promueve la resucitación de los bacilos que entraron en latencia, que presenta una deleción en fase de alrededor de 240pb en *M. bovis* respecto de *M. tuberculosis*, que lleva a la síntesis de una proteína de menor peso molecular. Otras de las familias de proteínas donde se encuentra la mayor variabilidad entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* es la familia de las proteínas PE-PGRS y PPE. La secuencia mostró que existe una variación en al menos 29 y 28 respectivamente de los miembros de estas familias debido principalmente a deleciones. A su vez la familia ESAT-6 posee seis miembros que se hallan deletados en el genoma de *M. bovis*. Las consecuencias de la variabilidad observadas

en ambas familias de proteínas aún son difíciles de predecir pero muy posiblemente afecten tanto el rango de hospedador, tropismo celular y carga antigénica. Por otra parte una de las mayores fuentes de variabilidad observada en el secretoma *M. bovis* es la expresión altamente elevada de dos antígenos serodominates: MPB70 y MPB83 (Hewinson *et al*, 1996). MPB83 es una proteína glicosilada asociada a pared celular y MPB70 es una proteína secretada que constituye casi el 10% del contenido proteico del sobrenadante de cultivo de *M. bovis.*

Si bien la secuencia nucleotídica de *M. bovis* es 99% idéntica a la de *M. tuberculosis*, al analizar la composición de los genes regulatorios se observa que esta identidad disminuye considerablemente, por ejemplo el gen *alk*A que codifica para una proteína reparadora de ADN en *M. tuberculosis,* en *M. bovis* presenta un cambio de marco de lectura que lleva a la síntesis de una proteína truncada, esta mutación afectaría la posibilidad de *M. bovis* de responder a stress nítrico. Así también el regulador AsnC/Lrp que se observa sobreexpresado en *M. tuberculosis* como respuesta a la falta de nutrientes, presenta una deleción de 8 aminoácidos que impedirían la unión al ADN blanco en el genoma de *M.bovis*. En la Figura 5 se observa un esquema de las diferencias mencionadas.

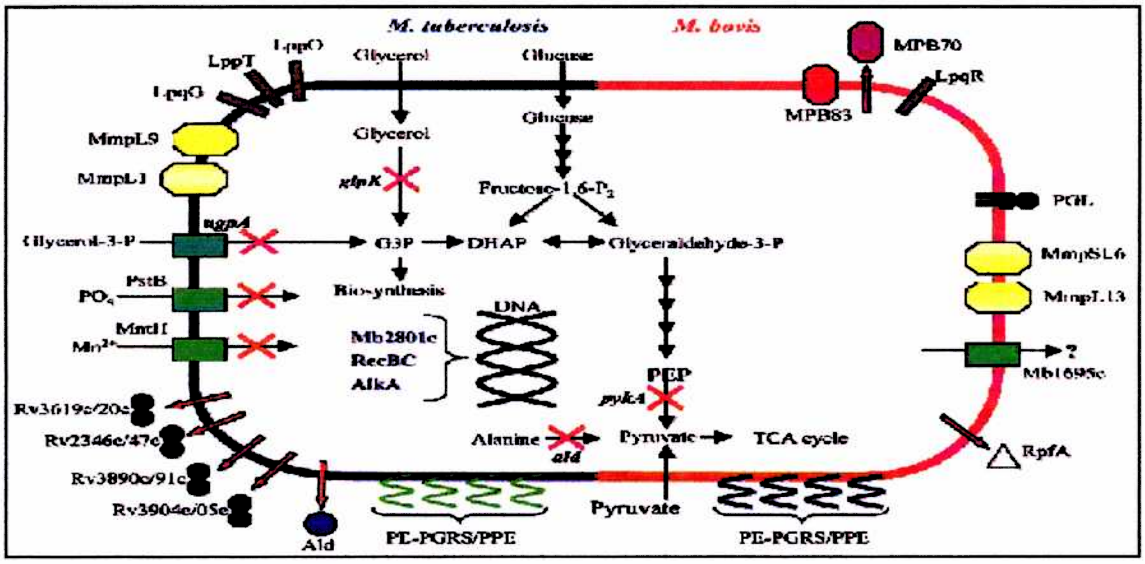


Figura 5: Esquema de las principales diferencias entre *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AF2122/97

En etapas previas a la secuenciación se realizaron análisis por hibridación a ADN genómico de *M. tuberculosis* y se observó que *M. bovis* presenta alrededor de 11 deleciones que oscilan entre 1kb. a 12.7kb., afectando un número importante de posibles factores de virulencia como también a un rango muy variado de funciones metabólicas (Figura 6), datos que pudieron ser confirmados posteriormente con la obtención de la secuencia (Gordon *et al*, 1999a; Zumárraga *et al*, 1999c). La pérdida de la región denominada RD5 (Región de diferencia 5) removió genes que codifican para tres fosfolipasas (*plc*D), las cuales han sido identificadas como factores de virulencia en otras bacterias tales como *Listeria monocytogenes*; a pesar de ello un cuarto gen para fosfolipasa esta presente en *M. bovis* posiblemente compensando la pérdida de los otros tres.

Otra de las regiones deletadas en *M. bovis* es la RD7 en la codifica para uno de los operones *mce*. La primera proteína MCE fue descripta originalmente por Riley y col. como una invasina putativa micobacteriana (Arruda *et al*, 1993). La secuencia del genoma reveló que en realidad existen cuatro operones *mce* en *M. tuberculosis* que codifican para una familia de 24 proteínas, por ello es posible que la pérdida de uno de estos operones en *M. bovis* se vea compensada por la presencia de los tres restantes (Santangelo *et al*, 2002).

Como se mencionó anteriormente la familia ESAT6 también se halla afectada por deleciones. ESAT6 está codificada en el *locus* RD1 el cual está presente en todas las *M. bovis* salvajes, pero está ausente en *M. bovis* BCG y en *M. microti*. Este conocimiento ha llevado a desarrollar métodos de diagnóstico que permitan diferenciar entre ganado que ha sido vacunado con BCG de aquel que presenta una infección con *M. bovis* (Pollock *et al*, 1997; Sorensen et *al*, 1995); sentando las bases para distinguir entre animales infectados de vacunados con BCG, lo que posibilitaría de ser así, la utilización de BCG en el bovino, dado que actualmente la vacunación con dicha vacuna no es aceptada debido a que interferiría con el uso de la PPD como método de diagnóstico.

El análisis y la distribución de las regiones deletadas sobre un rango de cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* revelaron que estas regiones son especie-específicas. Como ejemplo de ello el estudio de aislamientos de *M. bovis* provenientes de cabras revelaron que la región RD4 estaba presente en estos aislamientos. Esto sugiere una conexión entre este *locus* y la virulencia para el hospedador caprino (Gutiérrez *et al*,1997).

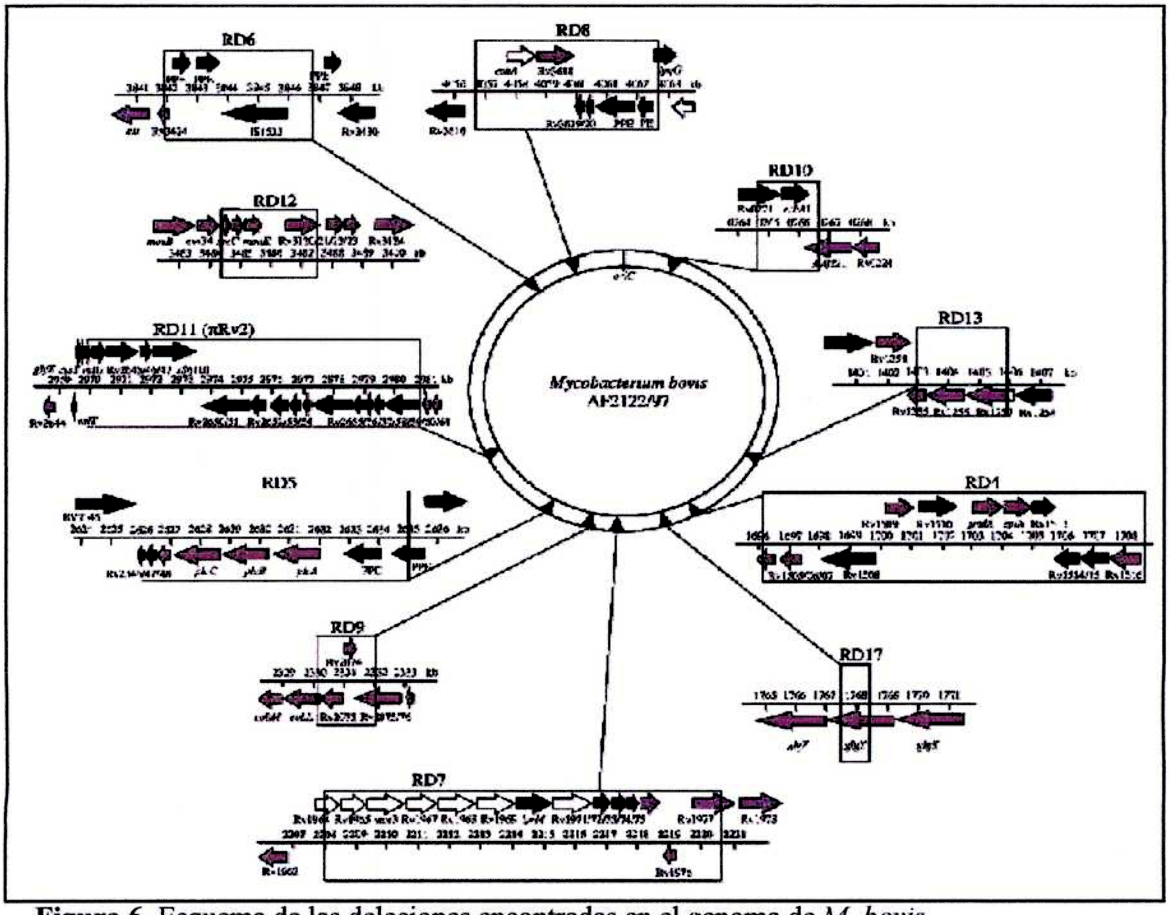


Figura 6. Esquema de las deleciones encontradas en el genoma de *M. bovis*

3.14. Genómica en *M. microti*

M. microti fue aislada en el año 1930 a partir de un ratón europeo denominado "*vole*" y más recientemente en pacientes inmunosuprimidos (Boisvert, 1966; van Soolingen *et al*, 1998). Hasta el día de hoy se consideraba que *M. microti* era sólo patógena para *vole*, pero no para humanos e incluso ha sido utilizada como vacuna viva en la década del 60 por el *Medical Research Council* (MRC) en el Reino Unido en protocolos que involucraban grandes poblaciones humanas (Hart *et al*, 1967). Otra cepa de *M. microti*, OV166, ha sido

utilizada como vacuna viva en Checoslovaquia. (Sula *et al*, 1976) En total alrededor de medio millón de recién nacidos fueron vacunados con esta cepa en un período de 18 años donde la vacunación con *M. microti*, confirió una protección segura contra la tuberculosis equivalente a la obtenida con BCG.

A pesar de ello cepas que han sido clasificadas como *M. microti* en función de su crecimiento lento y de su spoligotipo característico, han sido aisladas recientemente en humanos (Niemann *et al*, 2000). Por esta razón recientemente Brosch y col. llevaron adelante un estudio comparativo mediante la hibridización a genotecas de BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) de la cepa de referencia OV254 de *M. microti*, donde se hibridaron distintos aislamientos de *M. microti* provenientes tanto de roedores como de humanos (Brodin *et al*, 2002). Tanto los aislamientos de *vole* como los de humano, carecen de las regiones RD3, RD7, RD8, RD9 y RD10 así como de una región específica denominada RD1mic. RD1mic se superpone parcialmente con la región RD1 de *M. bovis* BCG. Por otro lado los aislamientos de vole perdieron parte de la región RD5, mientras que esta región esta presente en los aislamientos de humanos. Además de las regiones mencionadas se encontraron en ese mismo trabajo 3 regiones específicas de *M. microti*, denominadas MiD1, MiD2 y MiD3 que están ausentes en los demás miembros de Complejo. (Tabla 3). MiD1 removió parte de la región DR en *M. microti* lo que contribuye a su particular patrón de spoligotyping que presenta muy pocos de los espaciadores presentes en las demás especies

Región	Inicio-Fin (Kb)	Superposición de los MLAs	Gen y función putativa o familia probable a la que pertenece el producto
RD10	264.5-266.5	Rv0221-Rv0223	*ech*A
RD3	1779.5-1788.5	Rv1573-Rv1586	Proteínas de bacteriófagos
RD7	2207.5-2220.5	Rv1964-Rv1977	*yrb*E3A y 3B,*mce*3A a 3F, proteínas desconocidas
RD9	2330-2332	Rv2072-Rv2075	*cob*L, oxidasa probable, proteínas desconocidas
RD5^{mic}	2627.6-2633.4	Rv2348-Rv2352	fosfolipasas, miembro de la familia PPE
MiD1	3121.8-3126.6	Rv2816-Rv2819	Transposasa IS*6110*, proteínas desconocidas
MiD2	3554.0-3755.2	Rv3187-Rv3190	Transposasa IS*6110*, proteínas desconocidas
MiD3	3741.1-3755.7	Rv3345-Rv3349	Miembros de la familia PE-PGRS y PPE, elementos de inserción
RD8	4056.8-4062.7	Rv3617-Rv3618	*eph*A, *lpq*G, miembros de la familia PE-PGRS
RD1^{mic}	4340.4-4354.5	Rv3864-Rv3876	Miembros de la familia CBXX/CFQX, miembros de la familia PE y PPE, ESAT6,CFP10, proteínas desconocidas

Tabla 3. Descripción de las funciones putativas de los Marcos Lectura Abierto (MLAs) truncados y delecionados de *M. microti* OV254 respecto de *M. tuberculosis* H37Rv (Brodin *et al*, 2002).

3.15. Genómica Comparativa

A partir de la secuenciación de los genomas pertenecientes a de especies pertenecientes al mismo género o incluso a distintas cepas de la misma especie, surge lo que se denomina "Genómica Comparativa". En el caso de las micobacterias se han utilizado diferentes metodologías para la comparación de los genomas de las especies pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis,* éstas incluyen desde la utilización de microarreglos de ADN, mediante los que se han podido identificar distintos eventos de deleciones (Behr *et al*, 1999; Gordon *et al*, 1999b; Kato-Maeda *et al*,2001; Salamon *et al*, 2000), hasta las comparaciones de los genomas completos a través de hibridaciones a genotecas de BACs o por análisis de los mismos "*in silico*" (Brosch *et al*, 1998; Gordon *et al*, 2001a; Brosch *et al*, 2002;). Estas últimas permiten detectar desde el polimorfismo en un único nucleótido (SNPs) hasta rearreglos de genes completos. La mayoría de dichos estudios se realizaron comparando cepas virulentas con avirulentas, en la búsqueda de diferencias relacionadas a la patogenicidad, al rango de huésped y también para explicar las diferencias fenotípicas observadas entre los miembros del Complejo (Cole, 2002).

Un resultado destacable de la comparación genómica completa entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* fue el descubrimiento de la presencia intacta de los genes *mmp*S6 y *mmp*L6 (*Major Membranes proteins*) en esta última, por el contrario se ha observado que en muchas cepas de *M. tuberculosis* estos genes están truncados. Esta región que se denominó TbD1, siendo éste uno de los pocos ejemplos de funciones truncadas específicamente en *M. tuberculosis* (Brosch *et al*, 2002).

Los SNPs ocurren en el genoma del Complejo *M. tuberculosis* en muy baja frecuencia, alrededor de 1 cambio entre 2000 a 4000pb, dependiendo de la especie (Sreevatsan *et al*, 1997) pero a pesar de esto algunos cambios son responsables, como en el caso del gen *pnc*A, de la resistencia a pirazinamida (Scorpio y Zhang, 1994).

Como se dijo previamente, las inserciones y deleciones parecen ser la principal fuente de diversidad en el Complejo *M. tuberculosis*, muchas de estas inserciones resultan de eventos de transposición donde generalmente se encuentra involucrada la IS*6110*. Las deleciones pueden ser divididas en dos grupos: las recientes y las más antiguas; las deleciones antiguas ocurrieron en diferentes etapas de la especiación y se encuentran ampliamente distribuidas en varios miembros del Complejo; en cambio las deleciones más recientes tienen una distribución específica más restringida. Ejemplos de éstas últimas son las 4 deleciones mediadas por la IS*6110* (RvD2-RvD5) ocurridas en *M. tuberculosis* H37Rv y debido a que esta cepa ha mantenido hasta el día de hoy su virulencia en modelos animales es evidente que estas deleciones no afectaron completamente la patogenicidad (Brosch *et al*, 1999; Ho *et al*, 2001).

A través del uso de genotecas de BACs de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG Pasteur y de microarreglos de ADN, Gordon y col. y Behr y col. (Gordon *et al*, 1999a, Behr *et al*, 1999) realizaron comparaciones del genoma completo de ambas especies pudiendo identificar un total de 14 regiones de diferencia (RD1-RD14) que estaban ausentes en *M. bovis* BCG respecto de *M. tuberculosis*. Los genes involucrados en las distintas regiones

identificadas y las especies en las que se encontraron dentro del Complejo *M. tuberculosis* se resumen en la tabla 4. En la tabla 5 se resumen las regiones ausentes en *M. tuberculosis* H37Rv.

RDs	Especies que presentan la deleción	Genes, MLAs afectados	Tamaño (kb)	Función
RD1	Todas las *M. bovis* BCG	Rv3871- Rv3879c	9.5	PE, PPE, ESAT.
RD2	Algunas *M .bovis* BCG	Rv1978-Rv1988	10.8	Metiltransferasas, Permeasa, MPT64, ribonucleótido redustasa, proteínas de membrana y secretadas, LysR, regulador transcripcional
RD3	*M. africanum, M. microti,* Algunas *M. bovis* Todas las *M. bovis* BCG	Rv1573-Rv1586c	9.2	Profago PhiRv1
RD4	Algunas *M. bovis.* Todas las *M. bovis* BCG	Rv1505c Rv1516c	12.7	Varias proteínas de membrana y enzimas involucradas en la síntesis de exopolisacáridos
RD5	*M. microti* *M. bovis* *M. bovis* BCG	Rv2346c-Rv2353c	9	ESAT-6, Miembros de la familia PE, PPE, Fosfolipasa C
RD6	Variable en todas	Rv3425-Rv3428c	4.9	Proteínas PPE, IS1532
RD7	Todas excepto *M. tuberculosis* y *M. canetti*	Rv1964-Rv1977	12.7	Varias proteínas de integrales y exportadas de membrana, invasina MceP
RD8	*M. bovis* *M. microti* *M. bovis* BCG	EphA-*lpq*G	5.9	Epoxido hidrolasa, monooxigenasa, lipoproteína, ESAT-6, PE, PPE
RD9	Todas excepto *M. tuberculosis* y *M. canetti*	CobL-Rv2075	2	Precorrina metilasa, oxidoreductasa, proteína exportada
RD10	*M. bovis* *M. microti* M *bovis* BCG	Rv0221-Rv0223c	1.9	Enoil-CoA hidratasa, Aldehído dehidrogenasa
RD11	*M. bovis* BCG, *M. bovis*	Rv2645-Rv2695c	11	Profago phiRv2
RD12	*M. bovis* BCG, *M. bovis*	SseC-rv3121	2.8	Tiosulfato sulfurtransferasa, factor convertidor de la molibdopterina, metiltransferasa, Citrocomo P450
RD13	*M. bovis* BCG, *M. bovis*	Rv1255c-Rv1257c	3	Regulador transcripcional, citocromo P450, dehidrogenasa
RD14	Algunas *M.. bovis* BCG	Rv1765c-Rv1773c	9	PE-PGRS, IclR, regulador transcripcional
TbD1	*M. tuberculosis*	*mmp*S6-*mmp*L6	2.1	Proteínas de membrana

Tabla 4. Regiones deletadas o truncadas en el Complejo *M. tuberculosis*.

Regiones	Genes	Tamaño (kb)
RvD1	Rv2020-Rv2023- Rv2024	5
RvD2	plcD	5.1
RvD3	Rv1761-Rv1765	1
RvD4	PPE	0.8
RvD5	*moa*	4

Tabla 5. Regiones deletadas de *M. tuberculosis* H37Rv.

3.16. Evolución del Complejo *M. tuberculosis*

En estudios posteriores se analizó la presencia de las regiones de diferencias (RD) en distintos aislamientos de las diversas especies para determinar su distribución y establecer un posible cuadro evolutivo del Complejo *M. tuberculosis*

Dado el inusual grado de conservación de los genes metabólicos del Complejo *M. tuberculosis*, se ha sugerido que sus miembros sufrieron un cuello de botella en el momento de la especiación que se estima ocurrió alrededor de entre 15.000 y 20.000 años atrás, (Sreevatsan *et al*, 1997); también se ha especulado que *M. tuberculosis* ha evolucionado a partir de *M. bovis* por adaptación de un patógeno animal a un hospedador humano (Stead *et al*, 1995). Sin embargo ambas hipótesis fueron propuestas antes de la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*, gracias a la cual se pudieron confirmar las distintas RDs, previamente descriptas.

En su estudio evolutivo sobre un total de 100 cepas pertenecientes a las distintas especies del Complejo, Brosch y col. encontraron fuerte evidencia que las deleciones de ciertas regiones genómicas variables no ocurrieron independientemente en diferentes cepas del Complejo *M. tuberculosis*, asumiendo que existe poca o ninguna recombinación entre segmentos cromosomales de varios linajes del Complejo. A su vez los autores proponen que la conservación que existe en las secuencias flanqueantes de la región TbD1 en todas las cepas de *M. tuberculosis* que carecen de la misma, sugiere la descendencia desde un único clon. La deleción mencionada, es un perfecto indicador de que las cepas modernas de *M. tuberculosis*, responsables de la mayoría de los casos de tuberculosis actuales; definitivamente sufrieron ese cuello de botella y luego se diseminaron alrededor del mundo (Brosch *et al*, 2002). Resultados de este mismo estudio muestran indefectiblemente que *M. bovis* conlleva numerosas deleciones respecto de *M. tuberculosis*, lo que pudo confirmarse a partir de la secuenciación del genoma de *M. bovis* que reveló no tener regiones específicas de *M. bovis* (Garnier *et al*, 2003). En un estudio reciente de este mismo grupo de trabajo, se

evaluó la variabilidad genética entre distintas especies de micobacterias y en particular entre micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* mediante al utilización de comparaciones bioinformáticas de los genomas micobacterianos disponibles, conjuntamente con la utilización de la tecnología de los macroarreglos genómicos. Los autores extienden el cuadro evolutivo propuesto en el trabajo mencionado previamente, a partir de la descripción de nuevas RDs características de una determinada especie, como por ejemplo la región RD2*seal* (Marmiesse *et al*, 2004). En trabajos anteriores realizados en el laboratorio de TBB del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar, sobre aislamientos provenientes de mamíferos marinos susceptibles a la tuberculosis, no siempre quedaba claro si la enfermedad era causada por *M. tuberculosis* o por *M. bovis*, debido a que estos aislamientos comparten características genéticas de ambas especies (Zumárraga *et al*, 1999a). A partir de las secuenciación de los distintos genomas micobacterianos y la introducción de la tecnología de microarreglos pudo determinarse que los bacilos de mamíferos marinos no presentan las regiones de diferencias RD7, RD8, RD9 y RD10 al igual que *M. bovis* y en particular la mencionada RD2*seal*, es específica de estos aislamientos. Estos marcadores, conjuntamente con el polimorfismo en la proteína *mmp*L6 mencionado previamente, y el nuevo polimorfismo en la proteína pks15/1 identificado por Brosch y col., mostraron que los aislamientos de mamíferos marinos se encuentran evolutivamente más cercanos a *M. bovis* que a *M. tuberculosis*. Por ende su posición en el cuadro evolutivo de las micobacterias (Figura 7) permite situarlas incluso más cercanas a *M. microti*, que también carece de las regiones RD7-RD10 y comparten el polimorfismo observado en *mmp*L6. Si bien Brosch y col. continúan situando a esta especie como perteneciente a *M. bovis* se cuenta con la suficiente evidencia, para ubicarla lo suficientemente distante tanto de *M. tuberculosis* y en particular de *M. bovis* como para ser considerada una nueva especie. Esto último fue establecido recientemente por Cousins y col. sugiriendo a *M. pinnipedii* como nombre para este bacilo (Cousins *et al*, 2003).

Similarmente a lo que ocurre con *M. pinnipedii*, se encuentran los asilamientos provenientes de cabras en España, los cuales fueron considerados primeramente como pertenecientes a *M. bovis* (Figura 7), recientemente distintos estudios han permitido elevar a dichos aislamientos a la categoría de subespecie dentro del Complejo *M. tuberculosis* denominada *M. bovis* subsp. *caprae* (Niemann *et al*, 2002; Aranaz *et al*, 2003).

En la Figura 7 puede observarse la redefinición el nuevo cuadro evolutivo propuesto para las micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* (Marmiesse *et al*, 2004)

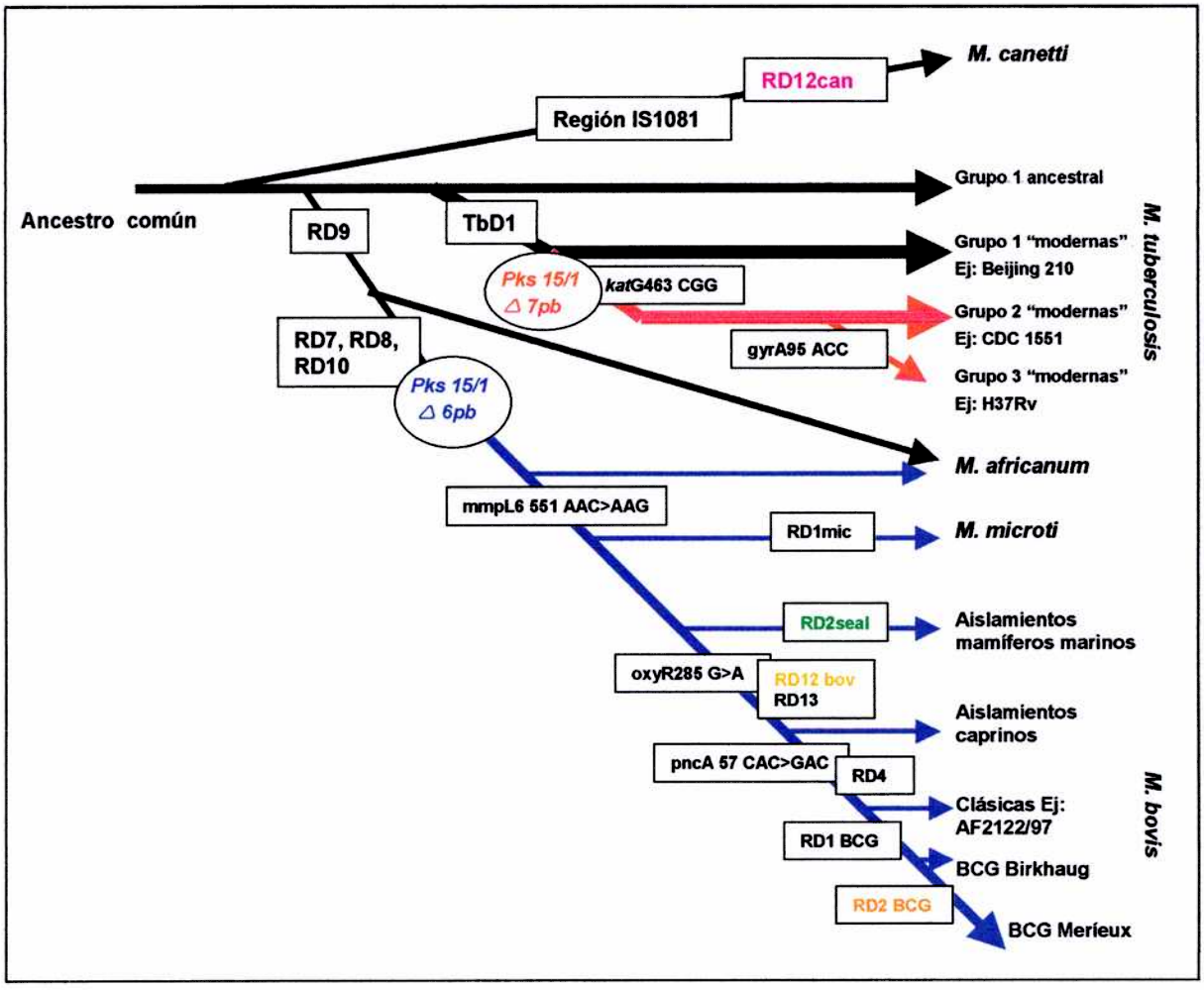


Figura 7. Esquema del proceso evolutivo propuesto para el bacilo tuberculoso que ilustra las sucesivas pérdidas de ADN en ciertos linajes. Las flechas rojas muestran que todas las cepas chequeadas en este grupo presentan una deleción de 7bp. en el gen *pks*15/1, a diferencia de lo que ocurre con las cepas del linaje que da origen a *M. bovis* las que presentan una deleción de 6pb en este gen (flechas azules) (Marmiesse *et al*, 2004).

4. HIPOTESIS

De acuerdo a los antecedentes mencionados anteriormente se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis General:

Las características particulares de las micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* responsables de enfermedades zoonóticas, podrían ser explicadas a través de la identificación de regiones específicas y polimórficas no descriptas previamente, que aportaran nuevos elementos en la diferenciación y tipificación de dichas micobacterias.

Hipótesis Particulares

- Los spoligotipos carentes de gran números de espaciadores en *M. bovis* y *M. pinnipedii* pueden explicarse por la presencia de nuevos espaciadores ausentes en la técnica actual que permitirán incrementar el poder discriminatorio de esta técnica.
- El origen evolutivo de la Región DR en micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* podrá establecerse a través del análisis comparativo de las regiones flanqueantes a esta región, en otras especies de micobacterias.
- Regiones genéticas específicas aún no descriptas, podrán ser identificadas mediante genómica comparativa entre miembros del Complejo *M. tuberculosis* con muy diferente rango de hospedador, virulencia y patogenicidad.
- El análisis detallado del genoma completo de *M. bovis* permitirá encontrar marcadores para la identificación, tipificación y posible especiación en esta micobacteria.

5. OBJETIVOS.

Objetivo General:

Profundizar el estudio genómico de los miembros pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* responsables de enfermedades zoonóticas, a fin de identificar regiones genómicas específicas que permitan explicar diferencias fenotípicas observadas, y a su vez permitan obtener un mejoramiento en la diferenciación y tipificación de dichos miembros.

Objetivos particulares:

- Incrementar la capacidad de discriminación del spoligotyping como método de tipificación de *M. bovis* y *M. pinnipedii*
- Establecer un posible origen evolutivo de la Región DR en las micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis.*
- Identificar nuevas secuencias o características genómicas específicas de *M. bovis*, *M. microti* y *M. pinnipedii.*

Materiales y Métodos

6. MATERIALES Y METODOS

6.1.1. Cepas utilizadas

Micobacterias:

Complejo *M. tuberculosis*:

Aislamientos humanos de *M. tuberculosis* y *M. tuberculosis* "cepa M" (Rittaco *et al*, 1997 y Morcillo *et al*, 1996) provenientes del Hospital Cetrángolo donación de la Dra. Nora Morcillo.

Aislamientos bovinos y humanos de *M. bovis* de distintas zonas geográficas de Sur América que forman parte de la colección de nuestro laboratorio (Zumárraga *et al*, 1999b).

Aislamientos de *M. microti* provenientes de Holanda, donación del Dr. Dick van Soolingen.

Aislamientos de *M. pinnipedii* obtenidos de lobos marinos de la costa atlántica Argentina (Romano *et al*, 1995; Bernardelli *et al*, 1996), donación de la Dra. Bernardelli.

ADN genómico de *M. bovis* subsp. *caprae* donación del Dr. Stefan Niemann, Alemania

Cepas de referencia: *M. tuberculosis* H37Rv (Steenken y Gardner, 1946), *M. tuberculosis* CDC1551 *M. bovis* AN5, *M. bovis* AF2122/97 (Garnier *et al*, 2003), *M. bovis* EUA y *M. bovis* BCG Pasteur.

Otras micobacterias:

Complejo *M. avium: M. avium, M. avium* subsp. *paratuberculosis*

Otras micobacterias: *M. smegmatis* mc^2 155, forma parte de la colección de cepas presentes en el laboratorio.

Otras bacterias:

E. coli DH5α.

6.1.2. Cultivo de las bacterias.

Las micobacterias fueron cultivadas en medio Middlebrook 7H9 Broth Base (BBL) suplementado con 10% de medio de enriquecimiento ADC (Glucosa 2% y Sero-Albúmina Bovina 5%) y 2.5% de Tween-80 20%. En el caso particular de *M. tuberculosis* se suplementó este medio con glicerol 0.4% y en el caso de *M. bovis, M. pinnipeddi* y *M. microti* se utilizó piruvato de sodio 0.4%. Los cultivos en medio sólido se realizaron en medio Stonebrink para *M. bovis*, *M. pinnipeddi M. microti* y en Lowestein-Jensen para *M. tuberculosis.*

Todas las manipulaciones de micobacterias patógenas se realizaron en gabinetes de bioseguridad y las micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* fueron tipificadas por spoligotyping para su identificación y control de posible contaminación.

Las cepas de *E. coli* DH5α fueron cultivadas en medio LB (Difco) para su crecimiento en suspensión y en medio LB-agar para su crecimiento en placa. En cada caso se suplementó con los antibióticos correspondientes.(100mg/ml Amplicilina y 12.5μg/ml Cloranfenicol).

6.2. Extracción de ADN genómico.

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el protocolo descripto por van Embden y col. (van Embden *et al*, 1992). En dicho protocolo se inactiva la muestra por calentamiento a 80°C durante 30 min. en *buffer* Tris/HCl pH:8-EDTA (TE) 1X. Luego se incuba con 50μl de Lisozima (10mg/ml) una hora a 37°C. Posteriormente se incuba a 65°C durante 10 min. con 75μl de SDS (10%,Sigma) / Proteinasa K (10mg/ml, Bhoeringer) y se agregan 100μl de ClNa 5M y 100μl de CTAB (N-cetyl-N,N,N,trimethyl ammnium bromide, Merck) y se incuba a 65°C durante 10 minutos. Finalmente se agregan 750μl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), y después de centrifugar a 12000rpm., 5 min. Se

extrae la fase acuosa, se transfiere a un tubo nuevo agregando 450µl de isopropanol para precipitar el ADN. La precipitación se realiza durante toda la noche a -20°C. El precipitado de ADN, que se obtiene luego de centrifugar 12000rpm, 15 min., se lava con 1ml. de etanol 70% se deja secar a temperatura ambiente y se resuspende en 20µl de *buffer* TE 1X.

Todos los ADNs utilizados en este trabajo de tesis fueron chequeados por spoligotyping para determinar que se trataba del ADN correcto y que no se presentaban contaminaciones.

6.3. Estudio de la Región DR en *M. bovis*

6.3.1. Elección de los aislamientos

La elección de las cepas para el estudio de la Región DR en *M. bovis* se realizó en función de los spoligotipos generados en el laboratorio a partir de aislamientos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Se eligieron cepas de *M. bovis* que presentaran ausencia de una elevada cantidad de espaciadores. Para esta parte del estudio también se incluyeron cepas de *M. pinnipedii* que presentan un spoligotipo característico con ausencia de gran cantidad de espaciadores. (Figura 3 de la Introducción)

Las cepas fueron elegidas en base a los spoligotipos predominantes identificados previamente en nuestro laboratorio por Zumárraga y col. (Zumárraga *et al*, 1999b), donde la cantidad de espaciadores ausentes consecutivos oscila entre 5 y 20. Para facilitar la identificación de dichos patrones se les asignó una letra identificatoria, arbitrariamente se denominaron: A (5 espaciadores faltantes 8-12, spoligotipo 34, según Zumárraga y col.), B (10 espaciadores faltantes 5-14, spoligotipo 4), C (20 espaciadores faltantes 4-23, spoligotipo 3), E (cepa con la mayoría de los espaciadores presentes, spoligotipo 12) y D (spoligotipo característico de *M. pinnepidii*). Se incluyó también la cepas *M. bovis* BCG (Figura 1).

Para el análisis de frecuencia de aparición de los espaciadores descriptos en este trabajo, se utilizaron 10 aislamientos de *M. tuberculosis* y 10 de *M. bovis.*

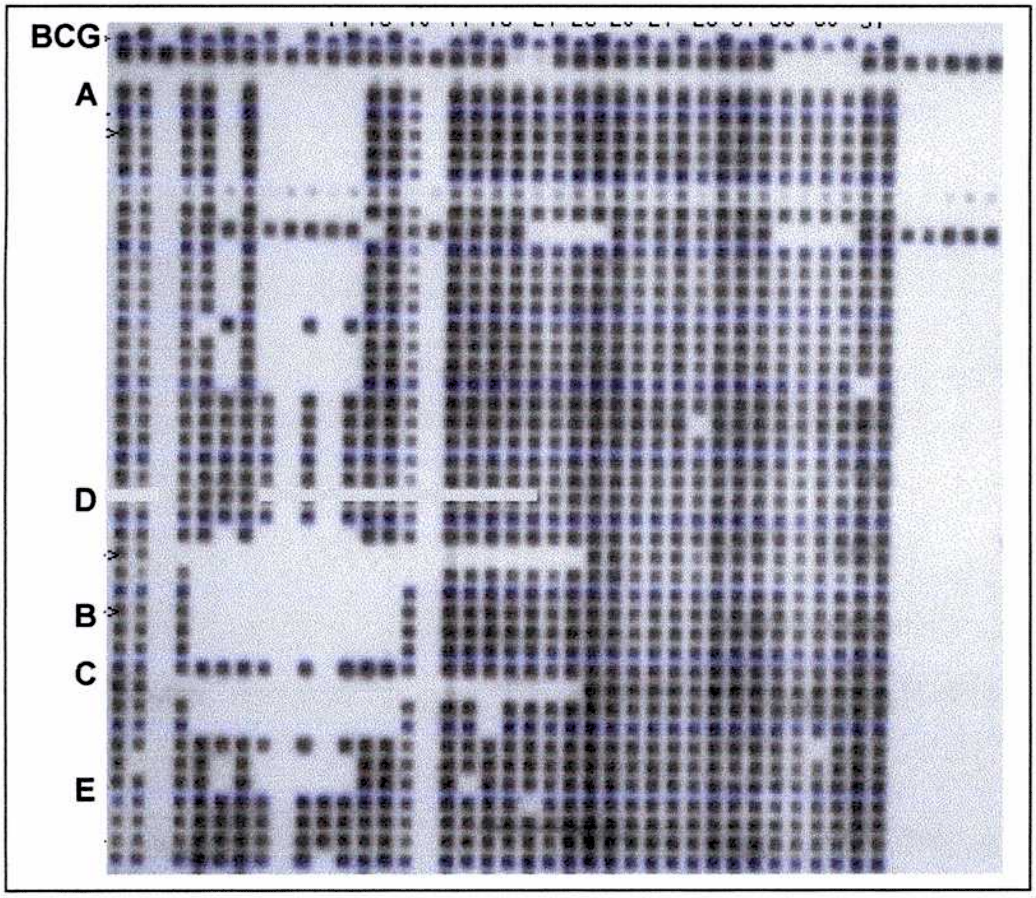


Figura 1. Patrones de spoligotyping de los aislamientos elegidos para el estudio de la Región DR.

6.3.2. Amplificación por PCR de la Región DR en *M. bovis*

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la amplificación corresponden a 25pb de la secuencia de los espaciadores adyacentes a la zona de espaciadores ausentes en cada spoligotipo. Se denominaron de acuerdo al número del espaciador al cual hibridizan y fueron obtenidos a partir de las secuencias publicadas de las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M.bovis* EUA (Beggs *et al*, 1996). La secuencia de cada uno es:

sp 1:5′ ATAGAGGGTCGCCGGTTCTGGATCA3′

sp2: 5′CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG3′

sp 5: 5′TTTTCTGACCACTTGTGCGGGATTA3′

sp 7: 5'GAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGC3'

sp 13: 5'GGGAGAGGGAATGGCAATGATGGTC3'

sp 17: 5'CGGAGTCATCCGCGCGGGCCGGCGC3'

IS left:5'TGACCCACCTGACATGACCCCAT3' corresponde a la zona 5'de la IS*6110*

790: 5'CATGGCACGGCAGGCGTGGCTA3'

863: 5'GGGCCGTGGGGCACTTACGG3'

1377: 5'GCATGCAGCATGCCGTCCCCGTT3'

1080:5'GGAGCCGTGCACATGCCGTGGCTCAGG3'

1453:5'CGCCATCATCCGGCGCCGCAGCTCCGC3'

Los cinco últimos corresponden a la secuencia de los espaciadores hallados en este trabajo y se utilizaron para analizar la frecuencia de los mismos en cepas de *M. tuberculosis* y de *M. bovis* (Caimi *et al*, 2001).

La reacción de PCR se llevó a cabo según el protocolo utilizado por van Soolingen y col. (van Soolingen *et al*, 1995). Se utilizó un volumen final de reacción 50µl.

Reactivos	**Concentración final**
10X *Buffer* Thermophilic DNA Polymerase	1X
25mM $MgCl_2$	2,5mM
40mM dNTPs	3,2mM
5U/ ul Taq Polimerasa	0,025U/µl
Oligonuucleótidos iniciadores directo y reverso	5ng/µl
ADN molde	0.2ng/µl

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Trio-Thermoblock (Biometra, Alemania), mediante el siguiente programa: 1 ciclo de 94°C, 3min.; 30 ciclos de 94°C 1min., 55°C a 60°C, 1min. y 72°C, 30seg. y finalmente 1 ciclo de 70°C 10min. La temperatura de hibridación se varió entre los valores señalados de acuerdo a

las características de cada ADN molde y de la combinación de oligonucleótidos iniciadores utilizada en cada caso. (Tabla 1).

Cepas/ Oligonucleótidos iniciadores		**2-17**	**5-13**	**7-13**	**7-17**	**1-ISleft**	**2-Isleft**	**5-ISleft**
M. bovis.(spo34)	A	+	+	+	+	-	-	+
M. bovis. (spo12)	E	+	+	-	+	-	-	-
M. bovis. (spo 4)	B	+	-	+	-	-	-	+
M. bovis .(spo3)	C	-	-	-	-	+	+	-
M. pinnipedii	D	-	-	-	-	-	-	+
M. bovis BCG		+	+	+	+	+	-	+

Tabla 1. Combinaciones de ADNs molde y oligonucleótidos iniciadores. Realizado +. No realizado -.

Los productos de amplificación fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8%-1.2%, Bromuro de Etidio 500µg/ml. en *buffer* Tris Borato-EDTA (T.B.E), pH:8.2 1X a 10V/cm durante 30 min. aproximadamente. Posteriormente se visualizaron con luz U.V. y se fotografiaron con un sistema de digitalización de imágenes.

6.3.3. Clonado de los productos de amplificación.

Una vez confirmada la presencia de bandas de los tamaños predichos, se procedió a la purificación de las mismas a partir del gel de agarosa utilizando columnas comerciales. (Qiaquick Gel Extraction Test Kit, Qiagen). El vector utilizado para el clonado fue pGEM-T.(Promega) y las ligaciones se realizaron en 10µl. de volumen final usando 50ng de pGEM-T (Promega), 10 a 100ng. de producto de PCR, 1U/µl de Ligasa T4 (T4 ADN Ligasa, Promega) y 1ul de *buffer* de T4 ADN Ligasa 10X; durante 16hs. a 4°C.

6.3.4. Transformación y aislamiento de los plásmidos recombinantes.

Las transformaciones se llevaron a cabo en *E. coli* DH5α competentes de alta eficiencia de transformación. La transformación se realizó mediante choque térmico a 42 °C durante 2min Se colocaron aproximadamente 50μl de las células competentes preparadas de acuerdo a protocolo de Ausubel y col. (Ausubel *et al*, 1995) y se incubó 1h. a 0°C. Se recuperaron las bacterias en 200μl de LB sin antibiótico y se plaquearon en LB-agar suplementado con 100μg/ml de Ampicilina, 100mM IPTG y X-gal para selección de las colonias blancas, descartándose las azules. Los clones positivos se repicaron a medio líquido LB-Ampicilina y se crecieron 16hs. a 37°C. El protocolo utilizado para realizar las preparaciones de plásmidos fue el sugerido por el proveedor del kit *Wizard Plus Minipreps* (Promega, EUA).

La digestión del plásmido recombinante se realizó en un volumen final de 10μl; utilizando 1U/μl de *Eco*Rl (Promega) en el *buffer* correspondiente durante 90min. a 37°C. La verificación de la presencia de los insertos se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa 0.8% *buffer* TAE 1X.

6.3.5. Secuenciación de los insertos y análisis de la secuencia

Los insertos fueron secuenciados usando el método de terminación de la cadena por dideoxinucléotidos o método de Sanger (Sanger *et al*, 1977). Para ello se utilizó el kit comercial "*fmol DNA Sequencing System*" (Promega, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa "*DNA Strider*" comparándolas con la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (www.genolist.pasteur.fr/TubercuList) y de *M. bovis* EUA (Beggs *et al*, 1996). El análisis se orientó en búsqueda de nuevos espaciadores.

6.3.6. Análisis de la frecuencia de aparición de nuevos espaciadores y valoración de su poder discriminatorio.

Con el objetivo de estudiar la frecuencia de aparición de los nuevos espaciadores encontrados en este trabajo se amplificó la zona 5' de la región DR de 10 aislamientos de *M. tuberculosis* y 10 de *M. bovis*. Se utilizaron para ello los oligonucleótidos iniciadores de la región 5' que se denominaron 790, 863, 1377,1080 y 1453 según su posición en la cepa de referencia *M. bovis* USA, en todos los casos la combinación fue con el oligonucleótido iniciador IS*left*. Las condiciones de amplificación no se variaron respecto de las descriptas previamente.

Para la determinación del poder discriminatorio de los nuevos espaciadores, es decir la capacidad de los mismos de subdividir distintos asilamientos pertenecientes a un mismo agrupamiento, se utilizó la misma estrategia de amplificación anterior usando cepas pertenecientes al patrón denominado A, que corresponde al spoligotipo 34 mayoritario hallado en las cepas de *M. bovis* en la Argentina (Zumárraga *et al*, 1999b).

6.4.1. Inclusión de los nuevos espaciadores en una nueva membrana de spoligotyping.

La secuencia de los espaciadores hallados en este trabajo fueron enviadas al Dr. van der Zanden del Departamento de Medicina Microbiológica y Enfermedades Infecciosas del *Gelre Hospital* de Holanda, para ser incluidos en nuevas membranas de spoligotyping. Con dichas membranas se determinó el poder discriminatorio entre cepas pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*. El Dr. van der Zanden utilizó estos y otros espaciadores provenientes de distintas cepas del Complejo como por ejemplo *M. canetti* (van der Zanden *et al*, 2002).

En conjunto el spoligotyping de nueva generación contiene un total de 104 espaciadores donde 51 espaciadores son nuevos y los restantes son los ya conocidos 43 espaciadores presentes en la membrana tradicional que derivan de la secuencia de la región

DR de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y de *M. bovis* BCG (Tabla 2). Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa Oligo 4.0 y se unieron covalentemente a un total de tres membranas de nylon como fue descripto previamente por Kaufhold y col. (Kaufhold *et al*, 1994). Los 43 espaciadores de las nuevas membranas corresponden a la secuencia complementaria a los espaciadores utilizados en la membrana de primera generación, las secuencias se rediseñaron con el objeto de obtener una mejor señal de hibridación y también para corregir errores presentes en la secuencia de los espaciadores 1 y 2 (van Embden *et al*, 2000). Los espaciadores fueron renumerados de acuerdo a su ubicación en la membrana diseñada por Kamerbeek y col (Kamerbeek *et al*,1997) y por eso difieren de la posición que poseen respecto del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

La secuencia de los 51 espaciadores nuevos, que representan los oligonucleótidos 44 a 95, derivan del estudio realizado por van Embden y col. (van Embden *et al*, 2000). Los 10 oligonucleótidos restantes 95-104, donde 5 espaciadores (95, 97, 99, 101 y 103) corresponden a la secuencia complementaria de los espaciadores 96, 98, 100, 102 y 104 respectivamente, son los descritos en este trabajo (Caimi *et al*, 2001). Por otra parte, uno de los oligonucleótidos de cada par fueron incluidos como duplicados en las membranas en la posición 51, 52, 45, 46 y 53 para que actúen de control interno de reproducibilidad en cada hibridación. Las secuencias de los espaciadores se ajustaron de manera de obtener una temperatura de hibridación (Th.) homogénea de la siguiente manera: Se utilizó Th. de 55.4°C +/- 1.5°C para la mayoría de los oligonucleótidos, excepto para los oligos 80, 101, 102, 103 y 104 donde se usó una Th. de 50.4°C; el oligonucleótido 55 con una Th. de 51.6°C, 95 y el 96 con Th. de 53.1°C, el 70 con Th. de 57.5°C y finalmente 99 y 100 con una Th. de 58.6°C. Las concentraciones de todos los oligonucleótidos fueron ajustadas a las mismas usadas en la membrana tradicional. (Tabla 2).

Tabla 2. Listado de la secuencia de los espaciadores del Complejo *M. tuberculosis*. a: Datos según Kamerbeek y col. b: Concentración de los oligonucleótidos en la membrana (pmoles); c: Secuencias presentadas 5-'3'; d: Secuencias en dirección 3'-5'; e: Oligonucleótido polimórfico en la posición 14.

Sp Memb.	Sp Gen.	Desig. previa a)	Concentración b)	Secuencia oligonucleótidos c)	Sp Gen.	Sp previa a)	Desig.	Concentración b)	Secuencia Memb. oligonucleótidos c)
1	2	1	300	CGCTCCCCTAGTCGT	53	17		150	TCTTGAGCAACGCCATC
2	3	2	150	TGGGCGACAGCTTTTGA	54	45		5	AAGTTGGCGCTGGGG
3	4	3	25	CTTCCAGTGATCGCCTT	55	48		1200	AACCGTCCCACCTG
4	12	4	30	TCATACGCCGACCAATC	56	49		5	AACACTTTTTTTGAGCGTGG
5	13	5	1000	TTCTGACCACTTGTGCG	57	50		10	CGGAAACGCAGCACC
6	14	6	150	TCATTTCCGGCTT	58	54		5	CGATCATGAGAGTTGCG
7	15	7	5	TGAGGAGAGCGAGTACT	59	55		5	TTTTCGCTGTTGTGGTTCT
8	18	8	600	TGAAACCGCCCCCAG	60	56 e)		10	AGCACCTCCCTTGACAA
9	19	9	10	ACTCGGAATCCCATGTG	61	57		25	TGCTGACTTCGCCTGTA
10	20	10	50	CTCTAGTTGACTTCCGG	62	58		75	CGAGCAGCGGCATAC
11	21	11	30	CAGGTGAGCAACGGC	63	59		100	GCATCCACTCGTCGC
12	22	12	10	ATGGGATATCTGCTGCC	64	60		75	TGGTAATTGCGTCACGG
13	23	13	25	ATTGCCATTCCCTCTCC	65	61		100	ACCATCCGACGCAGG
14	24	14	300	TTTCGGTGTGATGCGGA	66	66		700	CCACGCTACTGCTCC
15	25	15	200	TGAATAACGCGCAGTGAAT	67	67		20	CACCGCCGATGACAG
16	26	16	200	TCGCACGAGTTCCCG	68	68		300	GTGTTTCGGCCGTGC
17	27	17	30	CCGGCAACAATCGCG	69	69		5	GTTGCATTCGTCGACTG
18	28	18	1500	TGCAGATGGTCCGGG	70	70		400	GGCGGCGCCGAGAA
19	29	19	10	TTGCGCTAACTGGCTTG	71	71		10	TTCCATGACTTGACGCC
20	30	20	250	ATTTCCTTGACCTCGCC	72	72		100	CGATGCGGCCACTAG
21	31	21	50	CGATGTCGATGTCCCAA	73	73		5	GCTGACCCCATGGATG
22	32	22	5	ACGGCACGATTGAGACA	74	74		10	CAACAAGGTCTACGCGT
23	33	23	10	GTCCAGCTCGTCCGT	75	75		100	GATCAGGCGAAGGCG
24	34	24	60	GCCTGCTGGGTGAGA	76	76		10	ATTGCAGCGACGGGC
25	35	25	400	GGAGCCGATCAGCGA	77	77		5	CAACGACGCTGTATTGG
26	36	26	80	CTTCAGCACCACCATCA	78	78		5	AGCAGCATGGACGGTTT
27	37	27	25	TTCGTGATCTCTTCCCG	79	79		5	GCGGATGTGGTGGTC
28	38	28	5	GATCACAACACCAACTAATG	80	80		250	GTACATAGCGAGCTG
29	39	29	10	GAAATACAGGCTCCACG	81	81		5	GCCGCGGGTTTCGTT
30	40	30	5	TCTTGACGATGCGGTTG	82	82		10	GGGGCGTGTGTTCGT
31	41	31	5	TTCGCGTCAGACAGGTT	83	83		5	CTGGTGTGCTTATGCCT
32	42	32	50	ACTCCCGACCAAATAGG	84	84		5	CAAATGTTTGGACTGTGATC
33	43	33	250	TCGACACCGACATGAC	85	85		10	TTGTCGCGCGCCTTTTT
34	44	34	100	GAAGTCACCTCGCCC	86	86		10	GTTTCAGTTTTCTTGTCCC
35	46	35	10	AGTCCGTACGCTCGAAA	87	87		25	CTGGTTGTTGCCCGG
36	47	36	50	CGAAATCCAGCACCACA	88	88		5	TGTTCGGTGTTCTCCTG
37	51	37	50	TTTGAGCGCGAACTCGT	89	89		250	TCATGACGAGCCCGCA
38	52		75	TGGATGGCGGATGCG	90	90		10	ACACGGCCTGATCGGT
39	53	39	10	AAATCGGCGTGGGTAAC	91	91		20	CGGATTGTCTGGCCC
40	62	40	25	TCATACAGGTCCAGTGC	92	92		20	TAAGCACGCGTCTGTCA
41	63	41	25	GCTTTCCGGCTTCTATC	93	93		5	GACCACCGAATCACCAT
42	64	42	5	GACATGGACGAGCGC	94	94		5	TCTGGTAGTGGGCTTCT
43	65	43	50	CAGAATCGCACCGGG	95	11	1080	200	ACATGCCGTGGCTCA
44	1		500	CAACCCGGAATTCTTGC	96b	11	1080	350	TGAGCCACGGCATGT
45	5		600	CAGGCGTGGCTAGG	97	16	1377	100	CACGACGTTAGGGCA
46	6		500	GTCGCCGTAAGTGCC	98 d)	16	1377	150	ATGCCCTAACGTCGTG
47	7		20	GTTGACCACGAATTTTCAG	99	5	790	50	CGGCAGGCGTGGCTA
48	8		20	GCTGGCGCGCATCAT	100 d)	5	790	50	TAGCCACGCCTGCCG
49	9		50	CCATATCGGGGACGG	101 d)	6	863	1000	CACTTACGGCGACGG
50	10		10	GCGTCGTGCCATCAG	102	6	863	25	CCGTCGCCGTAAGTG
51	11		200	CCGTGCACATGCCGT	103	17	1453	20	GAGCAACGCCATCAT
52	16		25	ACGTTAGGGCATGCAG	104 d)	17	1453	40	GATGATGGCGTTGC

6.4.2. Realización del Spoligotyping de nueva generación.

El spoligotyping de nueva generación se realizó de acuerdo al método descripto previamente por Kamerbeek y col. La amplificación por PCR de los ADNs genómicos de cada cepa se realizó agregando 10ng de ADN a la misma mezcla de reacción presentada previamente. La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados en la reacción es: DRa: 5'GGTTTTGGGTCTGACGAC3', biotinilado en el extremo 5' y DRb: 5'CCGAGAGGGGACGGAAAC 3'. El programa de amplificación fue 1 ciclo inicial de desnaturalización a 96°C 3min.y 30 ciclos de 96°C, 1min, 55°C, 1min. de hibridación y 72°C, 30seg.y finalmente 72°C durante 10min de elongación.

Las condiciones de hibridación para la realización del spoligotyping de nueva generación se modificaron levemente respecto de las usadas para la membrana tradicional, donde la hibridación se realizó durante 45min. a una temperatura de 57°C en vez de los 60min. propuestos por Kamerbeek y col. debido a que no fue necesario el uso de un tiempo más prolongado.

6.4.3. Colección de aislamientos utilizados para evaluación del spoligotyping de nueva generación.

Las nuevas membranas se evaluaron utilizando 314 aislamientos pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* que incluyen *M. tuberculosis* (n = 303), *M. bovis* BCG (n = 4), *M. bovis* (n = 5), *M. microti* (n = 1) y *M. canetti* (n= 1), pertenecientes a la colección presente en el laboratorio del Dr. van der Zanden. A su vez el Dr. van der Zanden sumó 6 aislamientos clínicos de *M. bovis* BCG y 10 cepas vacunales de BCG (Glaxo, Tice, Connaught, Rusa, Moreau (Brasil), P3 (Holanda), Armand Frapier (Cánada), Tokio (Japón), Vien (Vietnam) y Behringer (Moscú)). Por otra parte se incluyeron en este estudio 68 aislamientos bovinos de *M bovis* presentes en nuestro laboratorio que pertenecen a los patrones de spoligotyping mayoritarios en Argentina.

Finalmente se incluyeron también 9 aislamientos de *M. bovis* subsp. *caprae*, 6 provenientes de España y 3 de Alemania (Aranaz *et al*, 1999; Niemann *et al*, 2002).

6.4.4. Determinación del poder discriminatorio de los 104 espaciadores individualmente.

En función de identificar espaciadores redundantes entre el total de los 104 utilizados, así como su capacidad de discriminatoria, se omitió secuencialmente a cada uno de ellos a partir de todos los spoligotipos obtenidos con las nuevas membranas. La eliminación de cada uno de los espaciadores se realizó mediante el uso del programa Excel.

6.5. Estudio de la Región DR en otras micobacterias no pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*

Para determinar si los genomas de micobacterias no pertenecientes al Complejo, como *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. leprae* y *M. mariunm* contienen secuencias y marcos de lectura abiertos (MLAs) similares a aquellos adyacentes al *locus* DR de *M. tuberculosis*, se realizó una comparación bioinformática de los mismos y posteriormente se confirmaron las observaciones halladas *in silico*, mediante amplificación por PCR (Caimi y Cataldi, 2004).

6.5.1. Análisis *in silico*.

Los alineamientos de las secuencias aminoacídicas se realizaron utilizando bases de datos públicas en Internet. Se eligió la base de datos del sitio TIGR usando el programa Blastp para los genomas de *M. avium* y *M. smegmatis* aún no finalizados (www.tigr.org/tdb/mdbinprogress.html). Los parámetros usados fueron: Programa: Blastp, Alineamientos: 5, matriz: blosum62, corte: ninguno, esperado: 0.1, descripción: 5 y filtro: ninguno. Para el análisis de *M. leprae* se utilizó el Blatp del sitio

www.genolist.pasteur.fr/Leproma del Instituto Pasteur, con el algoritmo blast v2 del Ncbi. Para *M. ulcerans* se utilizaron los parámetros: -F:F; -e: 1e-3; -q: -1 ; -b: 20; -v: 20 y –S: 3 del sitio http://www.genopole.pasteur.fr/Mulc/BuruList.html. Finalmente las búsquedas de Tblastn se realizaron en los sitios: www.sanger.ac.uk/Projects/M_marinum para *M. marinum* y www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor, para *S. coelicolor* del Instituto Sanger de Gran Bretaña. Se utilizó el programa Artemis (Versión 4 para Macintosh del Instituto Sanger) para la comparación de las regiones selecionadas de los genomas de *M. smegmatis, M. avium, M. leprae* y *M. marinum.* Las búsquedas en Blastp de los MLAs identificados por Artemis se llevaron a cabo en el sitio: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST usando la base de datos en la modalidad nr.

6.5.2. Análisis *in vitro*.

La zona flanqueante de la Región DR en *M. avium* y *M. smegmatis* se amplificó por PCR. El programa usado en este caso fue el denominado de tipo *Touchdown* en el cual se utiliza un rango de temperaturas de hibridación. El ciclado fue: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 94°C 3min., 8 ciclos de 96°C 1min., 65°C 1min y 72°C 1min. disminuyendo la temperatura de hibridación 1°C por ciclo; a este ciclado se le agregaron 30 ciclos adicionales de 96°C 1min., 58°C 1min y 72°C 2min. y finalmente se realizó 1 ciclo de extensión a 72°C 10min. La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la amplificación del ADN genómico de *M. avium* es: MaDRdir2: 5′CGGCGGTTACCGCGACGATAC3′ y MaDRrev: 5′GCGATTGGCGGGAGCGAAATG3′. Para el caso de *M. smegmatis* los oligonucleótidos iniciadores fueron: MsDRdir:5′TCCCCTGCCCGCCGATCTCTA3′ y MsDRrev: 5′CGACTACGGAGGCTGCAAGAG3′. Ambos pares de oligonucleótidos iniciadores hibridan a la secuencia de los genes Rv2800 y Rv2825 homólogos de *M. tuberculosis* H37Rv en *M. avium* y *M. smegmatis* respectivamente

A su vez se aplicaron las mismas reacciones de amplificación utilizando los mismos oligonucleótidos iniciadores en una variedad de micobacterias pertenecientes y no pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis.* Dichas amplificaciones se llevaron a cabo a una temperatura de hibridación menor a la utilizada anteriormente para favorecer la hibridación a la secuencia blanco en las distintas especies.

6.6. Utilización de microarreglos genómicos.

6.6.1. Cepas seleccionadas:

Para la realización de las hibridaciones a microarreglos genómicos se trabajó con distintos aislamientos de dos especies pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*

En primer lugar se utilizaron 3 cepas de *M. microti* aisladas de humanos*: M. microti* 2272, *M. microti* 1204 y *M. microti* 1206 con spoligotipo tipo "vole", tipo llama y un spoligotipo inusual respectivamente. (Figura 2). También fue incluida en este estudio la cepa de referencia de *M. microti* OV254 de la colección del VLA (*Veterinary Laboratories Agency,* Surrey, GB*),* que presenta un spoligotipo vole característico. Las hibridaciones se realizaron conjuntamente con ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv.

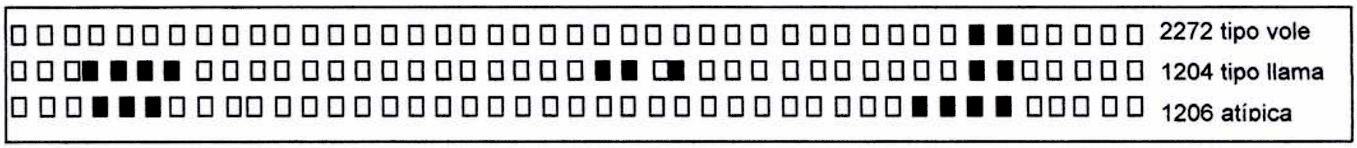


Figura 2: Spoligotipos de las cepas de *M. microti.*

En segundo lugar se trabajó con tres aislamientos de *M. pinnipedii* provenientes de lobos marinos (*Arctocephalus australis*) de la costa atlántica Argentina (Romano *et al*, 1995). En este caso los tres aislamientos utilizados presentaron el mismo spoligotipo. (Figura 3 de la Introducción, Figura 1 de esta sección). Las hibridaciones en este caso se

realizaron conjuntamente con ADN genómico de *M. bovis* AN5 proveniente de nuestro laboratorio, ADN de *M. bovis* AF2122/97 y con el ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv mencionado anteriormente.

6.6.2. Marcación del ADN genómico.

Los distintos ADNs genómicos fueron utilizados como molde para la marcación por incorporación directa de los fluoróforos: Cy3 o Cy5-dCTP, mediante una reacción de *ramdom priming*. Se utilizaron 2µg. de ADN genómico y 3µg. de oligonucleótidos al azar (Invitrogen, Paisley, GB) en un volumen final de reacción de 41.5µl. La mezcla de reacción se desnaturalizó 5min. a 95°C y se enfrió rápidamente en hielo. Se agregaron a la mezcla 5µl de *buffer* "React2" (Invitrogen, Paisley,GB), 1.5µl de dCTP marcado (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, GB), 1µl de solución de dNTPs (5mM de dATP, dGTP y dTTP y 2mM de dCTP) y finalmente 5U de la enzima Klenow (Invitrogen, Paisley, GB). Los ADN genómicos de las cepas chequeadas (*M. microti* y *M. pinnipedii*) fueron marcados con Cy5-dCTP y los ADNs genómicos de las cepas control *M. tuberculosis* y *M. bovis* respectivamente, fueron marcados Cy3-dCTP. Las reacciones se incubaron 90min. a 37°C y finalmente se mezclaron y purificaron utilizando columnas de purificación comerciales (Qiagen MinElute kit, Qiagen, Crawley, GB.).

6.6.3. Hibridación de los microarreglos de ADN.

Las hibridaciones fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Stephen Gordon en el Reino Unido (VLA, Woodham Lane, New Haw, Addlestone, Surrey, GB) utilizando en todos los casos los protocolos de hibridación sugeridos por el grupo de microarreglos bacterianos del Instituto *St. George* (www.sghms/ac/uk/depts/medmicro/bugs).

Se utilizaron dos tipos de microarreglos genómicos, en el caso de las hibridaciones con *M. microti* los microarreglos poseen todos los MLAs anotados presentes en el genoma de la cepa secuenciada *M. tuberculosis* H37Rv, en el caso de las hibridaciones con *M. pinnipedii* se utilizaron microarreglos que contienen los MLAs de *M. tuberculosis* H37Rv y de *M. tuberculosis* CDC1151, la segunda cepa de *M. tuberculosis* secuenciada. A su vez éste último posee los MLAs anotados que difieren por previo análisis genómico entre ambas cepas de *M. tuberculosis* secuenciadas y un aislamiento inglés de *M. bovis* denominado AF2122/97. En uno y otro tipo de microarreglos se encuentran fijados al soporte de vidrio, productos de PCR que corresponden a fragmentos internos de cada uno de los MLAs anotados y que abarcan un tamaño de entre 250 y 1000pb.

Los portaobjetos conteniendo los microarreglos fueron incubados en solución de prehibridización (SSC 3.5X, SDS 0.1% y BSA 10 mg/ml) 20min. a 65°C, se lavaron luego de centrifugar 5min. a 400g, en agua e isopropanol 1min. con cada uno, respectivamente. La mezcla de ADNs marcados se ajustó a un volumen de 55ul en SSC 4X / SDS 0.3%. Se desnaturalizó 2min. a 95°C, se enfrió a temperatura ambiente y se colocó sobre el microarreglo que se cubrió con un cubreobjeto de 110mm^2. Finalmente el portaobjeto se colocó en la cámara de hibridación y se incubó durante 16 a 20hs. a 65°C en oscuridad. Luego de la hibridación se realizaron los lavados correspondientes en SSC 1X/SDS 0.05% 2min. a 65°C. Seguidos de dos lavados a temperatura ambiente en SSC 0.06 X y luego se secaron por centrifugación. Los portaobjetos se escanearon en un lector "Affimetrix 428" y la intensidad de la fluorescencia en cada punto de hibridación se cuantificó utilizando el programa ImaGene 4.1 (Biodiscovery Inc., Marina del Rey, California, EUA). Para cada punto de hibridación el fondo de fluorescencia se sustrajo del promedio para obtener el valor relativo de cada uno.

6.6.4. Análisis de los datos obtenidos a partir de la hibridación a microarreglos.

El análisis de los datos se realizó utilizando el programa GeneSpring 5.0 (Silicon Genetics, Redwood City, Calif.,EUA). Se realizaron triplicados para cada uno de los ADN testeados y cada una de las intensidades observadas para cada gen se dividió por el valor obtenido para cada gen en los ADNs control (*M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AF2122/97) respectivamente y se calculó el promedio de la relación muestra/control. Se utilizó un punto de corte entre <0.5 y 2 en la relación muestra/control para la generación posterior del listado de deleciones.

6.6.5. Validación de los datos hallados por microarreglos de ADN

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores para el análisis por PCR de las deleciones halladas y su posterior secuenciación.

La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores para la deleción encontrada en *M. microti* fueron:

Af: 5′-TACTCTGCGACACCACGAAT-3′

Bf: 5′-GCGGACAGATACTGGTCATA-3′

Er: 5′-TCGGTTATGCCGCCGGTGAT-3′

Rv 3019 dir: 5'-GATGGCTCATGCCGGGGACAT-3'

Rv 3019 rev: 5'-CATGGTGTTGGACTCATGGGT-3'

Rv 3020 dir: 5'-AGGCGTTTCATCAGGGAGAGT-3'

Rv 3020 rev: 5'-TTCATTCCGAGCAGCGACTTT-3'

Las secuencia de los distintos oligonucleótidos iniciadores para el estudio de las deleciones halladas en *M. pinnipedii*, PiD1, PiD2, RD2mic y Rv3888 respectivamente son:

Dir3530: 5′-TGCACAAGGTTGCTTACGTC-3′

Rev:5′-ATTGCCTTTCCCTAGCTGGT-3′

OrfH2dir: 5′-AATGCCAGTTGCATTGCTAT-3′

12-25P: 5′-CAGATTCAAATGTCCGACCCG-3′

Rv1978: 5′-ATGGGTGAGGCGAACATC-3′

RD2-1979rev: 5′-ATCGGGCATCTATGTCGGTGT-3′

3888dir: 5′-CCTAGAGCACGACGTGATGA-3′

3888rev: 5′-GCATCCTTGTCGGTAATGCT-3′

Las amplificaciones se realizaron utilizando *Hot Start DNA Taq Polimerase* (Invitrogen),y Solución-Q (Promega) según las instrucciones de los fabricantes. Las condiciones utilizadas para el programa de ciclado fueron: 1 ciclo de desnaturalización de 95°C 15min., 35 ciclos de 95°C 1min., 1min. del paso de hibridación a 95°C y la extensión se realizó a 72°C durante 1min. por cada kb. a amplificar y un último ciclo de extensión 72°C 10min.

Los productos de amplificación fueron secuenciados por el método de Sanger en el servicio de secuenciación automática del CNIA (Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias) del INTA Castelar. El análisis de las secuencias se realizó por Blast comparando con el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv www.genolist.pasteur.fr/TubercuList y *M. bovis* AF2122/97 www.genolist.pasteur.fr/BoviList. Las secuencias flanqueantes a la deleción encontrada para *M. microti* (MiD4) se depositaron en la base de datos de EMBL, con el número de acceso AJ550619 y la región PiD1 de *M. pinnipedii* se depositó con el número.

6.6.5.1. *Southern Blot*

La presencia o ausencia en otras especies del Complejo *M. tuberculosis* de las deleciones encontradas en *M. microti* y en *M. pinnipedii* se analizaron por *Southern blot*

Las sondas utilizadas provienen de los productos de PCR obtenidos para *M. tuberculosis* y fueron marcadas con ^{32}P-dCTP por el método de "*ramdom priming*" según las instrucciones del fabricante del kit utilizado (Prime-A-Gene, Promega, EUA).

Para el análisis de la deleción de *M. microti* se utilizaron ADN genómicos de *M. tuberculosis*, *M. bovis* AN5, *M. pinnipedii* y los tres aislamientos utilizados para la realización del microarreglo. Los ADN genómicos (2μg) fueron digeridos la endonucleasa *NotI* durante 16hs. a 37°C en un volumen final de 20μl utilizando el buffer correspondiente. Esta enzima presenta un sitio de restricción en el gen Rv3020c a las 181pb. del mismo y ningún sitio en el gen Rv3019c.

En el caso de las deleciones encontradas en *M. pinnipedii* también se utilizaron ADN genómicos pertenecientes a distintas especies del Complejo *M. tuberculosis* y se incluyeron los aislamientos de *M. pinnipedii* a partir de los cuales se realizaron los microarreglos. En este caso las digestiones se realizaron utilizando 5U de *ClaI* para la deleción PiD1 y 10U de *SalI* para el análisis de la deleción PiD2.

Las digestiones se desarrollaron separadamente por electroforesis en geles de agarosa 0.8%, *buffer* TAE 1X. durante 16hs. Luego de la corrida, el gel se fotografió para poder determinar la localización de los fragmentos digeridos y realizaron los siguientes lavados. Se hidrolizó el ADN por incubación en HCl 0.25M, se desnaturalizó en NaCl 1.5M/NaOH 0.5M y por último se llevó a cabo la neutralización en 1.5M NaCl, 0.1M Tris-HCl, pH 7.5. El gel así tratado fue transferido mediante vacío a una membrana de Nylon (Magnacharge Nylon transfer membrane, 0.45 micrones, Osmonics inc, U.S.A.) en buffer SSC10X. El ADN transferido a la membrana fue fijado por exposición a la luz UV (0.120J/cm^2).

Las membranas fueron prehibridadas e hibridadas en una solución 1% SDS, 2.5X SSPE (10mM NAH_2PO_4, 0.18M NaCl, 1mM EDTA, pH:7.4), 0.1% Polianetol sulfato (PAES), y 0.01% Pirofosfato de Sodio (ppiNa) a 65°C durante toda la noche. La

prehibridación se realizó durante aproximadamente 3hs. a 65°C. Luego de la hibridación las membranas se lavaron para eliminar la unión inespecífica dos veces en 0.1X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente y un último lavado en 1X SSC, 0.1% SDS a 65°C. Se expusieron las membranas ante un film radiográfico (X-OMAT, Kodak) a –70°C que se reveló a las 24hs.

6.7. Análisis bioinformático del genoma completo de *M. bovis*

La secuencia completa del genoma de *M. bovis* AF2122/97 se comparó con la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv utilizando el programa Blastn y MSPCrunch y las diferencias fueron visualizadas a través del programa Artemis Comparison Tool (ACT 4, para Macintosh, Sanger Center).

En el análisis se buscaron diferencias entre ambos genomas que no fueran producto de la presencia de secuencias de inserción como IS*6110*, genes que codificaran para la familia de proteínas PE-PPE de conocido polimorfismo, secuencias que no hubieran sido previamente descriptas como regiones de diferencia (RDs) y finalmente polimorfismos de un único nucleótido (SNPs).

Los MLAs seleccionados se chequearon nuevamente mediante Blastn incluyendo al aislamiento *M. tuberculosis* CDC1551 del Centro de Control de Enfermedades (CDC) cepa que fue utilizada para la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis.*

6.7.1. Estudio *in vitro* de las secuencias encontradas *in silico*

A partir de las secuencias variables encontradas se diseñaron oligonucleótidos iniciadores para el análisis de estas diferencias mediante amplificación por PCR en distintas aislamientos de diferentes especies pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*. Para este estudio se utilizaron cepas presentes en nuestro laboratorio.

Las amplificaciones se realizaron como se describió previamente utilizando el denominado programa *Touchdown* y se ajustaron las temperaturas de hibridación de acuerdo a cada uno de los oligonucleótidos utilizados. Las secuencias de cada uno de ellos son las siguientes:

Rv3479rev: 5'CGACGCCGAGCACAAGTAGCA3'

Rv3479dir: 5'GAACCGCCAAGAAGGGAGAGG3'

RpfArev: 5'TCAGCCCGTCAGCCGATGAC3'

RpfAdir2: 5'GCGTGTACCGAGAGGAATTA3'

LppArdir 5'CGAAAGCCCACAGCAGTGATCG3'

LppBrev: 5'TGTCGACGCAGAACACCATCAC3'

Rv0647dir: 5'ATCACTTCGATACGGCCATC3'

Rv0647rev 5'GTGGAACCCATCTGAGCAGT3'

6.7.2. Análisis del gen *rpf*A en distintos miembros del Complejo *M. tuberculosis*

El gen *rpf*A fue elegido entre los marcadores analizados conforme a los resultados obtenidos a partir de la amplificación por PCR en distintos miembros del Complejo *M. tuberculosis* en particular se decidió secuenciar dos aislamientos de *M. bovis* locales que presentaron polimorfismos. Las secuencias se realizaron mediante el método de Sanger en el secuenciador automático de INTA Castelar y se compararon entre sí utilizando el programa *DNA Strider.*

Resultados

7. RESULTADOS

PARTE I: Estudio genómico de la Región DR

7.1. Estudio Genómico de la Región DR en *M. bovis*

El objetivo de esta primera parte del trabajo fue encontrar nuevos espaciadores presentes en la región DR de *M. bovis* que permitan incrementar la capacidad de discriminación del spoligotyping como método de tipificación

7.1.1. Análisis comparativo de la frecuencia de aparición de espaciadores de *M. bovis.*

El análisis se realizó cuantificando la cantidad de veces que aparece cada uno de los 43 espaciadores actuales presentes en la membrana de spoligotyping en un total de 548 aislamientos de *M. bovis* tipificados en nuestro laboratorio (Zumárraga *et al*, 1999b). Los resultados se muestran en la Figura 1. Estos indican que la mayor frecuencia de aparición se encuentra en los espaciadores 20 al 38, es decir son los más abundantes y comunes a todos los aislamientos de *M. bovis* tipificados, razón por la cual son poco discriminatorios y por ende no son apropiados para ser usados en la diferenciación. Los espaciadores 1 al 19, poseen una menor frecuencia de aparición, es decir tiene una abundancia relativa menor entre todas las cepas estudiadas, por lo que presentan mayor polimorfismo, siendo éstos más apropiados para la tipificación. Por otro lado los espaciadores 3, 9, 16 y 39 al 43 están ausentes en todas las cepas de *M. bovis* estudiadas en nuestro laboratorio. Estos resultados difieren de lo que ocurre con *M. tuberculosis*, donde los espaciadores presentan una frecuencia de aparición similar entre todos los aislamientos estudiados en el laboratorio, en este caso se observa que los espaciadores 33 al 36 están ausentes en la gran mayoría de las cepas analizadas (Figura 1).

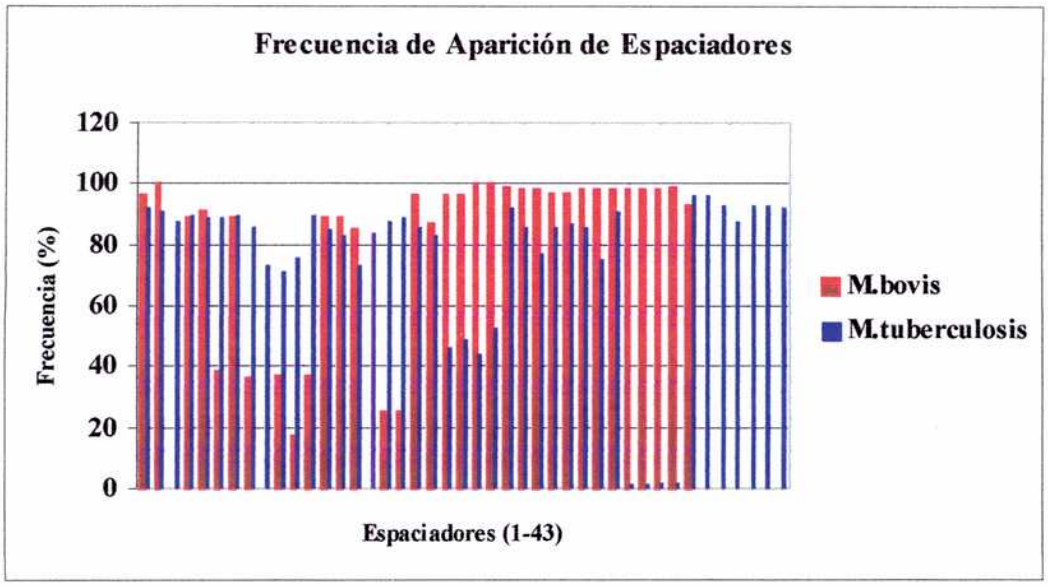


Figura 1.Comparación de la frecuencia de aparición de espaciadores en *M. bovis* y en *M. tuberculosis*

7.1.2. Identificación de nuevos espaciadores en diferentes aislamientos de *M. bovis*

Para identificar la presencia de nuevos espaciadores se eligieron aislamientos de *M bovis* que, de acuerdo a su patrón de spoligotyping, carecieran de distinta cantidad de espaciadores y fueran representativas de los spoligotipos más frecuentes entre las cepas de *M. bovis* de Argentina, en particular se utilizaron cepas que presentaron una ausencia de entre 5 y 21 del extremo 3. Se incluyeron además cepas que tuvieran spoligotipos completos, es decir con la mayor cantidad de espaciadores observados entre los asilamientos tipificados, es el caso del spoligotipo 12 (Figura 2). En este estudio también se incluyó una cepa de *M. pinnipedii*. Figura 2.

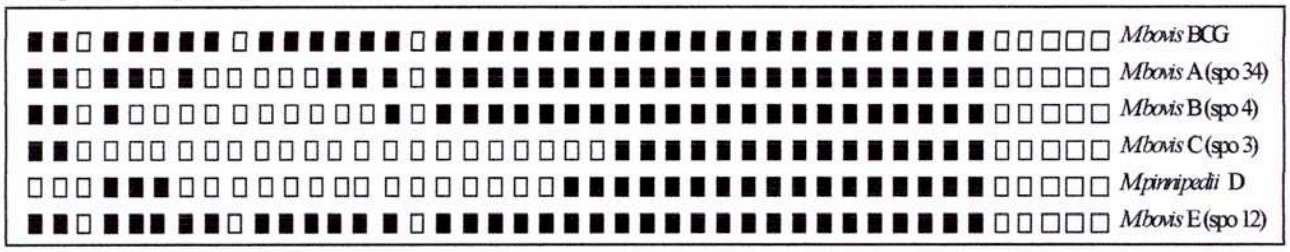
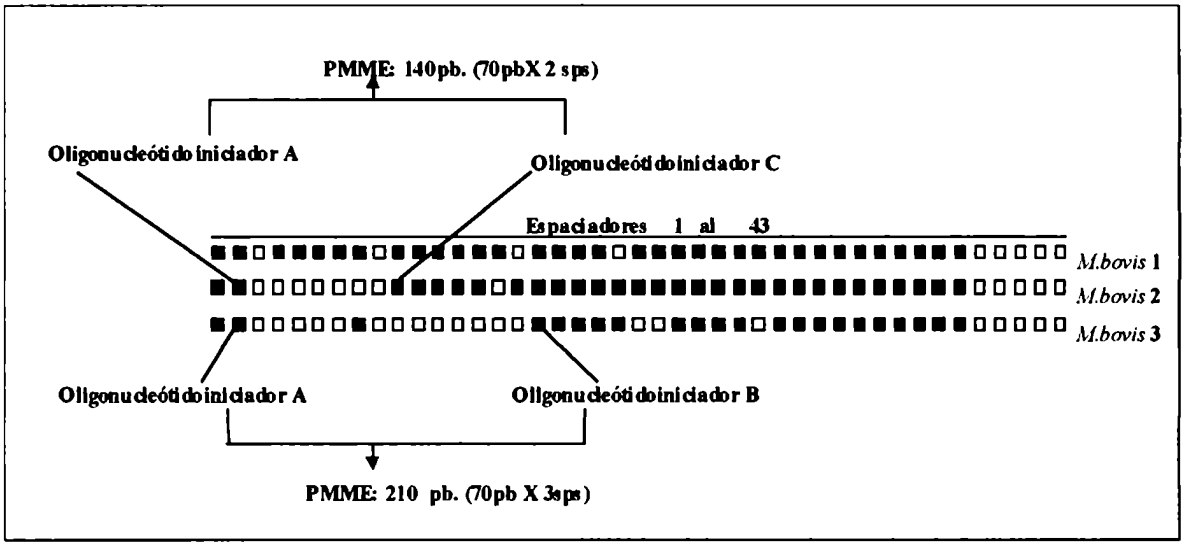


Figura 2. Spoligotipos representativos de las cepas elegidas. Entre paréntesis se indican los nombres de los patrones de spoligotyping según Zumárraga y col. (Zumárraga *et al*, 1999b).

Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores que hibridaran a los espaciadores flanqueantes a una zona de ausencia de hibridación y que permitieran amplificar por PCR dicha zona. Los productos de amplificación obtenidos se analizaron de acuerdo al siguiente criterio: el peso molecular de la banda obtenida se comparó con el correspondiente al calculado a partir del patrón de spoligotyping, el cual supone que el peso molecular mínimo esperado (PMME) del producto de PCR correspondería a la suma del peso molecular del par espaciador-DR (70pb. aproximadamente) multiplicado por el número de espaciadores observados para ese patrón determinado de spoligotyping. Esquema 1.



Esquema 1. Ejemplo que muestra la forma en que se calculó el PMME. *M. bovis* 1: Cepa con alto Nro de espaciadores, *M. bovis* 2: Cepa con 7 espaciadores faltantes y *M. bovis* 3: Cepa con 13 espaciadores faltantes.

Conforme a este criterio de selección cuando se obtuvo un fragmento amplificado de mayor peso molecular que el PMME se procedió al clonado de dicho producto, para luego secuenciar la zona amplificada y verificar si la diferencia se debía a la presencia de nuevos espaciadores. El análisis de los resultados obtenidos en cada reacción de PCR, la combinación de oligonucleótidos iniciadores utilizados y las cepas elegidas se muestran en

la Tabla 1. En la Figura 3 se observa un gel de agarosa representativo de algunos de los productos de amplificación obtenidos.

Combinación Oligonucleótidos	2-17		5-13		7-17		5-ISleft		1-ISleft		2-IS*left*	
Cepa	PCR	PMME	PCR	PMME	PCR	PMME	PCR	PMME	PCR	PMME	PCR	PMME
M. bovis A (spo 34)	SA		**1) 250**	**-210**	**2) 350**	**-350**	3) 1200	-980	NR		NR	
M. bovis B (spo 4)	**4) 200**	**-280**	NR		NR		**5) 950**	**-630**	NR		NR	
M. bovis C (spo 3)	NR		NR		NR		NR		**6) 400**	**-210**	**7) 300**	**-140**
M. pinnipedii D	NR		NR		NR		**8) 450**	**-350**	NR		NR	
M. bovis E (spo 12)	SA		9) 500	-560	10) 550	-630	NR		NR		NR	
M. bovis BCG	NR		**11) 500**	**-560**	12) 600	-630	13) 1250	-1260	NR		NR	

Tabla 1. Valores de PCR y PMME para cada par de oligonucleótidos iniciadores utilizados. Los valores están dados en pb. En negritas se muestran las amplificaciones que fueron clonadas y secuenciadas. NR: No realizado; SA: Sin amplificación.

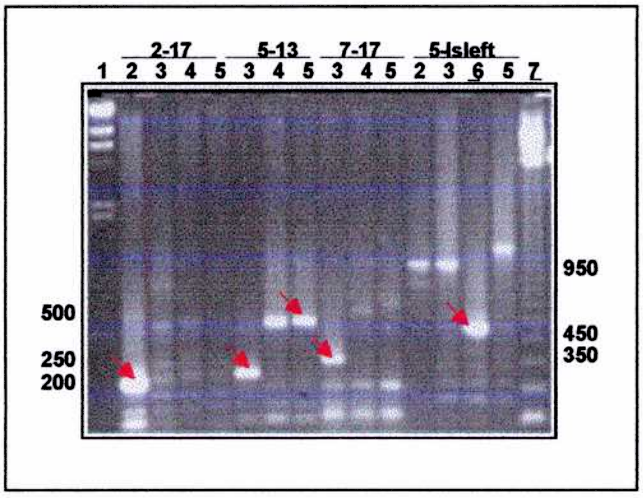


Figura 3. Amplificaciones de las cepas con las distintas combinaciones de oligonucleótidos iniciadores. Línea 1:MPM (Lambda Hind III); Línea 2: *M. bovis* B (spo 4), Línea 3: *M. bovis* A (spo 34), Línea 4: *M. bovis* E (spo 12), Línea 5: *M. bovis* BCG, Línea 6: *M. pinnipedii* y Línea 7: MPM (100pb., Promega, EUA).

***M. bovis* A (spo 34):** Los resultados obtenidos con la combinación 5-13 de oligonucleótidos iniciadores, muestran una banda de 250pb, que presenta diferencias con el PMME de aproximadamente 40pb. Con la combinación 7-17 no se observó diferencia de tamaños. Se decidió secuenciar las bandas denominadas 1 y 2 respectivamente.

***M. bovis* B (spo 4):** En este caso se clonó el producto obtenido con la combinación 2-17, (banda 4), que si bien presenta un peso molecular menor en la PCR con respecto al PMME, incluye el producto que se obtendría al usar el espaciador 5 como oligonucleótido iniciador en la PCR.

***M. bovis* C (spo 3):** Esta cepa se amplificó con la combinación 1-IS*left* y 2-IS*left*. Los resultados obtenidos muestran productos de amplificación que presentan diferencias importantes con el PMME en ambas combinaciones (bandas 6 y 7). Estos productos fueron clonados y secuenciados.

***M. pinnipedii* D:** La única amplificación que era posible realizar debido a la ausencia de gran número de espaciadores en esta cepa, de acuerdo su spoligotipo característico fue con los la combinación 5-IS*left* obteniéndose como resultado una diferencia de 200pb (banda 8) entre el PMME y el producto de amplificación; por este motivo este producto también fue clonado para posterior secuenciación.

***M. bovis* E (spo 12) y *M. bovis* BCG:** Estas cepas se utilizaron como controles de las amplificaciones dado que las mismas presentan patrones donde no se observa ausencia de más de 2 ó 3 espaciadores continuos. En el primer caso no se observaron diferencias donde el peso molecular de las bandas obtenidas en la PCR fuera mayor al del PMME y debido a que esta cepa posee la mayor cantidad de espaciadores respecto a las demás se decidió continuar el análisis con *M. bovis* BCG. Esta cepa mostró en la mayoría de los casos diferencias de alrededor de 50pb. Se decidió clonar entonces la banda 11 amplificada con los oligonucleótidos iniciadores 5-13, que a pesar de presentar un tamaño menor de producto de amplificación por PCR respecto del PMME, se consideró importante la secuenciación de este fragmento dado la característica de la cepa en cuestión.

7.1.3. Análisis de las secuencias realizadas.

Los resultados de la secuenciación se analizaron con el programa *DNA Strider*. En cada caso se buscó la presencia de espaciadores nuevos o que presentaran alguna variante de los ya conocidos, para ello se utilizó a las repeticiones directas como guía dentro del producto secuenciado.

***M. bovis* A (spo 34):** En el producto de PCR obtenido a partir de la amplificación con la combinación 7-17 (banda 2), se encontró un espaciador nuevo que se denominó 1377 y a partir de la combinación de oligonucleótidos iniciadores 5-13 (banda 1), se encontró un espaciador repetido ya presente en la membrana de spoligotyping, el espaciador número 7. Ambos se hallan en un ordenamiento relativo sp7-sp7-sp1377-sp13.

A pesar que en la cepa con patrón ***M. bovis* B (spo 4)** no se encontraron diferencias entre los valores de PCR y PMME con la combinación 2-17 (banda 4), el producto de amplificación fue secuenciado y se identificó un nuevo espaciador denominado 1080. El mismo está ubicado inmediatamente río abajo del espaciador 2.

***M. bovis* C (spo 3)** presentó dos espaciadores nuevos encontrados a partir de las amplificaciones con las combinaciones 1-IS*left* (5) y 2-IS*left* (banda 6). Se los denominó 790 y 863 respectivamente. Estos espaciadores se ubican en el siguiente orden: sp1-sp2-sp790-sp863.

El aislamiento de ***M. pinnipedii* (D)** presentó también un espaciador nuevo ubicado luego del espaciador 2, se denominó 1453.

El análisis de ***M. bovis* BCG** mostró dos de los espaciadores encontrados anteriormente 1377 y 1453, ambos ubicados río abajo del espaciador 7.

La secuencia de cada uno de estos espaciadores nuevos se observa en la Tabla 2. En todos los casos la denominación de los espaciadores corresponde a la posición de los

mismos en la región DR de la cepa *M. bovis* USA (Beggs *et al*, 1996), a partir de la cual se realizó la comparación de las secuencias.

Nombre Sp	Secuencia	Fuente	Spoligotipo
790	5' TCGCGGCGCGGCATGGCACGGCAGGCGTGGCTAGGG3'	*M. b.*	C (spo 3)
863	5' TGTGCGCCGTCGCCGTAAGTGCCCCACGGCCCGT3'	*M. b.*	C (spo 3)
1080	5' TTGAACACGGAGCCGTGCACATGCCGTGGCTCAGGGGT3'	*M. b.*	B (spo 4)
1377	5'ACGACGTTAGGGCATGCAGCATGCCGTCCCCGTTTT3'	*M. b.*	A (spo 34)
1453	5'GCTCTTGAGCAACGCCATCATCCGGCGCCGCAGCTCCGC3'	*M. p.*	D

Tabla 2. Secuencia de los nuevos espaciadores hallados (Caimi *et al*, 2001).

7.1.4. Frecuencia de aparición de los nuevos espaciadores.

Con el objeto de estudiar la frecuencia de aparición de los nuevos espaciadores en distintos aislamientos de *M. tuberculosis* y de *M. bovis*, se realizaron amplificaciones por PCR, utilizando a cada uno de ellos como oligonucleótido iniciador combinado con el oligonucleótido IS*left*.

La amplificación con la combinación 790-IS*left* fue positiva en 6 de las 20 cepas de *M. bovis* estudiadas (30%), en cambio con *M. tuberculosis* no se obtuvo amplificación positiva en ningún caso. Utilizando la combinación 863-Is*left*, 18/20 *M. bovis* fueron positivas (90%) y para *M. tuberculosis* se obtuvo 8/20 positivos (40%). El par 1080-IS*left* arrojó 16/20 positivos para *M. bovis* (80%) y sólo 1/20 para *M. tuberculosis* Usando la combinación 1377-IS*left* se obtuvo un 45% de positivos para *M. bovis* y nuevamente solo una positiva para *M. tuberculosis*. Finalmente para el par 1453-IS*left* 60% fueron positivas para *M. bovis* y 70% para *M. tuberculosis*. En la Figura 4 se muestran ejemplos de estas amplificaciones.

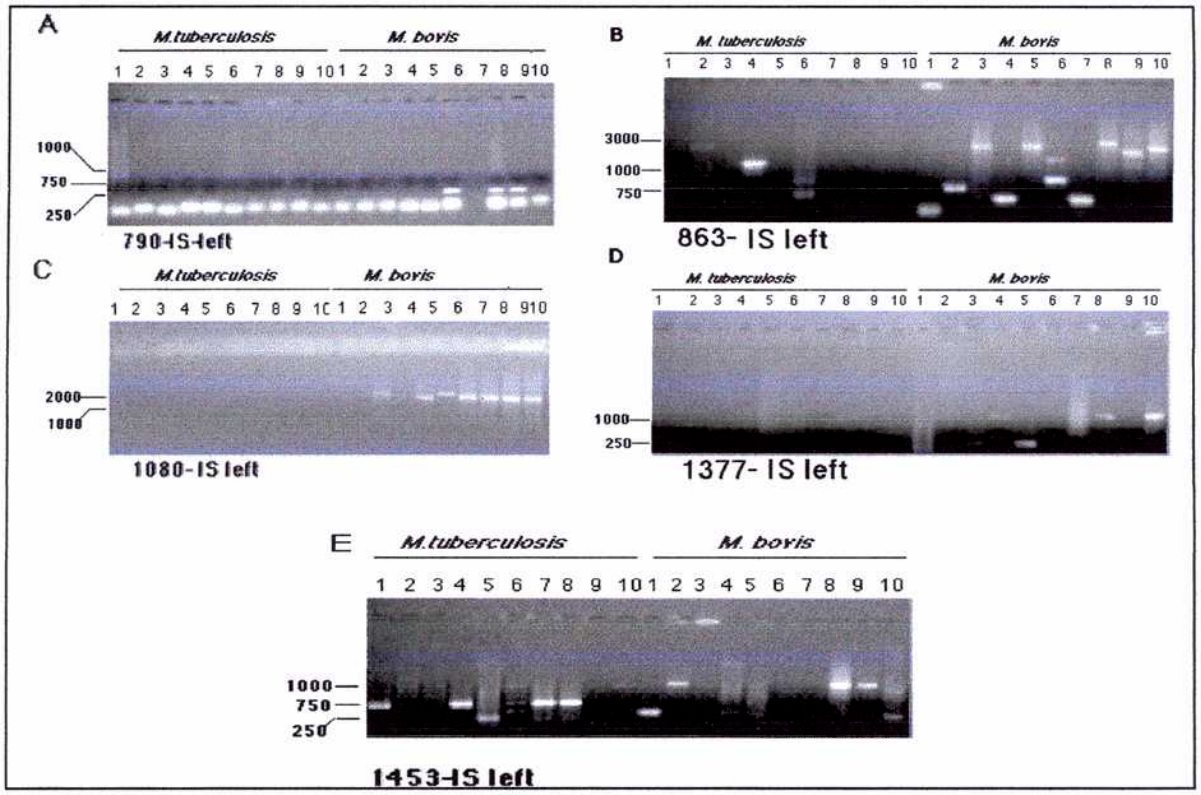


Figura 4. Amplificaciones usando las combinaciones sps-IS*left*

7.1.5. Poder discriminatorio de los nuevos espaciadores en *M. bovis* (spo 34).

Para realizar este análisis se utilizó la misma estrategia de amplificación descripta en el punto anterior en 10 cepas de *M. bovis* correspondientes al patrón mayoritario de las cepas de *M. bovis* en Argentina, el denominado spoligotipo 34, que fue elegido debido a que este es un grupo indistinguible por spoligotyping. (Zumárraga *et al*, 1999b) (Figura 1, Mat. y Mét.).

Utilizando la combinación 790-IS*left*, 8 de 10 fueron positivas (80%); usando la combinación 863-IS*left* el 100% de los aislamientos fueron positivos; con la combinación 1080-IS*left* fueron positivos 9 sobre 10 aislamientos (90%); del mismo modo que con la combinación 1377-IS*left* y finalmente con la combinación 1453-IS*left* 4 de 10 aislamientos fueron positivos (40%). Figura 5

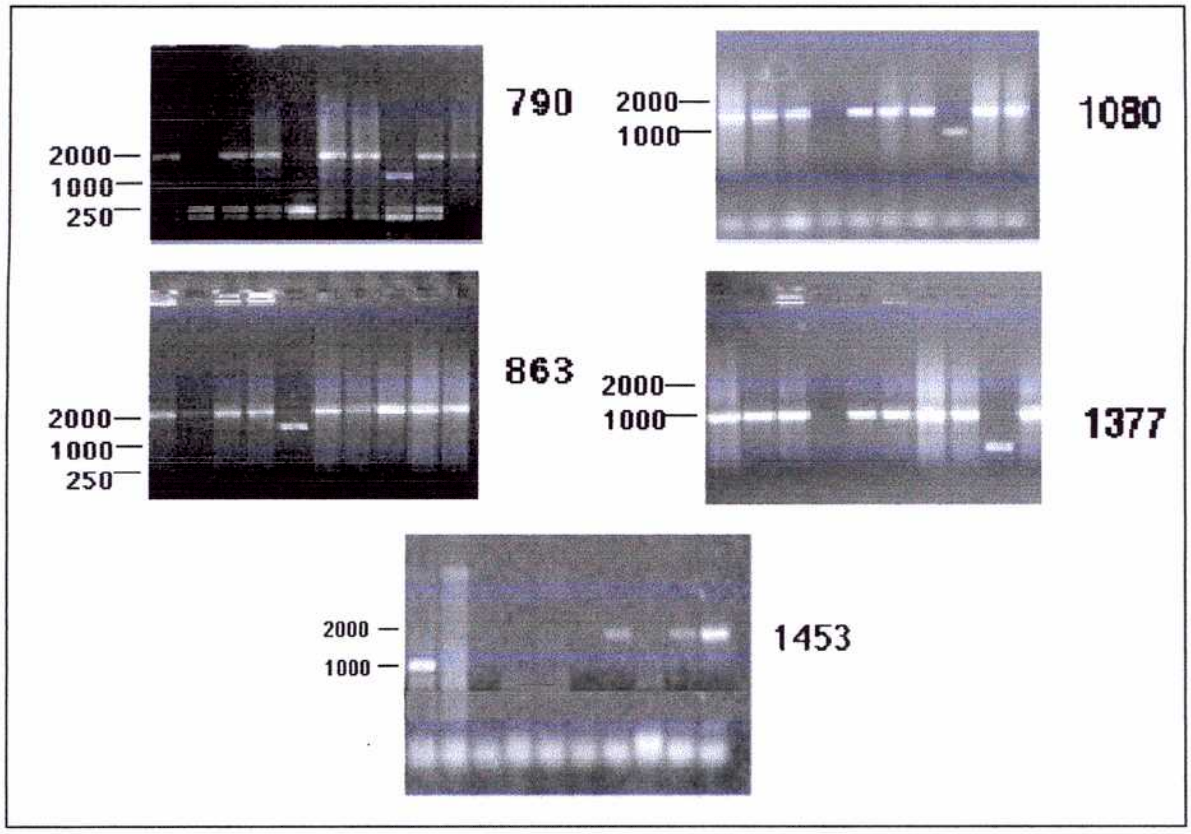


Figura 5. Amplificaciones en 10 aislamientos de *M. bovis* (spoligotipo 34).

7.1.6. Inclusión de los nuevos espaciadores en un spoligotyping de nueva generación.

En estudios previos acerca de la naturaleza de la variación genética en la región DR, se han descripto un total de 104 espaciadores (van Embden *et al*, 2000) que incluyen los cinco nuevos descriptos aquí (Caimi *et al*, 2001). Se decidió evaluar el valor potencial de los espaciadores recientemente descriptos, en cuanto a su poder discriminatorio como a su reproducibilidad objetivo para el cual se los incluyó en una nueva membrana de spoligotyping.

El estudio comprendió un total de 314 aislamientos pertenecientes al Complejo *M tuberculosis* que incluyen *M. tuberculosis* (n=303), *M. bovis* BCG (n=4), *M. bovis* (n=5), *M. microti* (n=1) y *M. canetti* (n=1) y 6 aislamientos clínicos adicionales de BCG junto con 10 cepas vacunales de la misma. Estos aislamientos pertenecen a la colección presente en el laboratorio del Dr. van der Zanden, Holanda. A dichos aislamientos se les sumó un total de

68 aislamientos bovinos de *M .bovis* de nuestro laboratorio que pertenecen a los patrones más frecuentemente hallados entre los aislamientos de nuestro país. En la Figura 6 se muestra el resultado comparativo de la realización del spoligotyping tanto con la membrana tradicional de 43 espaciadores, como con la membrana de segunda generación de 104 espaciadores (van der Zanden *et al*, 2002).

Cuando la membrana tradicional de 43 espaciadores fue utilizada en los 314 aislamientos del Complejo *M. tuberculosis*, se obtuvieron 45 grupos conteniendo un total de 196 aislamientos, mientras que 115 spoligotipos fueron encontrados una sola vez, obteniéndose 160 patrones de spoligotyping diferentes. El tamaño de los grupos varió entre los 2 a 31 aislamientos (Figura 6, A1 a A45). Por otro lado como resultado de la aplicación del spoligotyping de segunda generación, se obtuvieron 44 grupos en 184 aislamientos (Figura 6, B1 a B44), donde 130 spoligotipos se detectaron una sola vez de un total de 174 patrones diferentes de spoligotyping. En este caso el tamaño de los grupos varió entre los 2 a 29 aislamientos. Se desprende de estos datos, que se establecieron 14 spoligotipos adicionales a partir del uso de la nueva membrana. Adicionalmente con la utilización de la misma, se detectaron algunos spoligotipos predominantes sobre otros, por ejemplo el spoligotipo B42 se encontró 29 veces, el B39 12 veces, y tanto el B17 como el B2 aparecieron 11 veces. Los spoligotipos B42 y B39 son los más comúnmente encontrados a nivel mundial y son los denominados "spoligotipos 53 y 50" respectivamente por Sola y col (Sola *et al*,1999).

Los spoligotipos A20 y A24 que corresponden a los patrones de spoligotipos argentinos 34 y 12 respectivamente según Zumárraga y col. (Figura 7), son los más comunes dentro de las cepas de *M. bovis* cuando se utiliza la membrana tradicional de 43 espaciadores (Zumárraga *et al*, 1999b). En este caso se observa que estos dos spoligotipos se abren en 2 nuevos cada uno, al utilizar la membrana de 104 espaciadores. El patrón A20

que contenía 4 aislamientos se dividió en un grupo (B19) de tres cepas con idéntico patrón y una cepa con un patrón adicional.(Figura 7). Una de las cinco cepas (*M. bovis* BCG) presente en el spoligotipo A24 mostró también un único patrón con la membrana de 104 espaciadores, las cuatro cepas restantes presentaron un patrón común (B22) con la nueva membrana. Los aislamientos clínicos de *M. bovis* BCG y las cepas vacunales exhibieron el mismo spoligotipo al usar los dos tipos de membranas.

Con respecto a los aislamientos argentinos de *M. bovis*, se obtuvieron cuatro grupos con spoligotipos idénticos al utilizar el spoligotyping tradicional con 39, 8, 4 y 3 aislamientos respectivamente. Trece cepas mostraron spoligotipos individuales. Con la aplicación de las nuevas membranas se obtuvieron cinco grupos cada uno con idénticos spoligotipos con 28, 8, 6, 2 y 2 aislamientos respectivamente. En este caso fueron 21 las cepas con spoligotipos individuales. Por lo tanto usando el spoligotyping tradicional se obtuvieron 17 patrones diferentes, en cambio con las nuevas membranas los spoligotipos de estas cepas suman 26 patrones distintos (van der Zanden *et al*, 2002). La Figura 6 muestra un ejemplo de la autorradiografía del spoligotyping de segunda generación donde se muestran los resultados obtenidos con algunos aislamientos bovinos argentinos de *M. bovis*.

Asimismo de las nueve cepas de *M. bovis* subsp. *caprae* resultaron en un total de seis patrones con la membrana tradicional y ocho con la membrana de 104 espaciadores (van der Zanden *et al*, 2002).

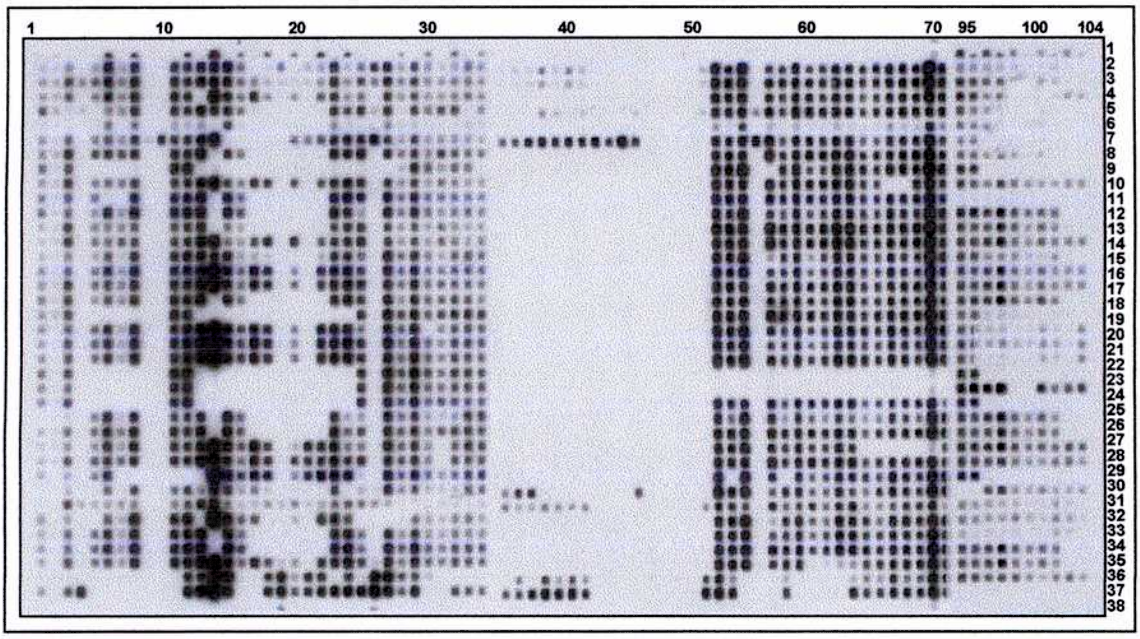
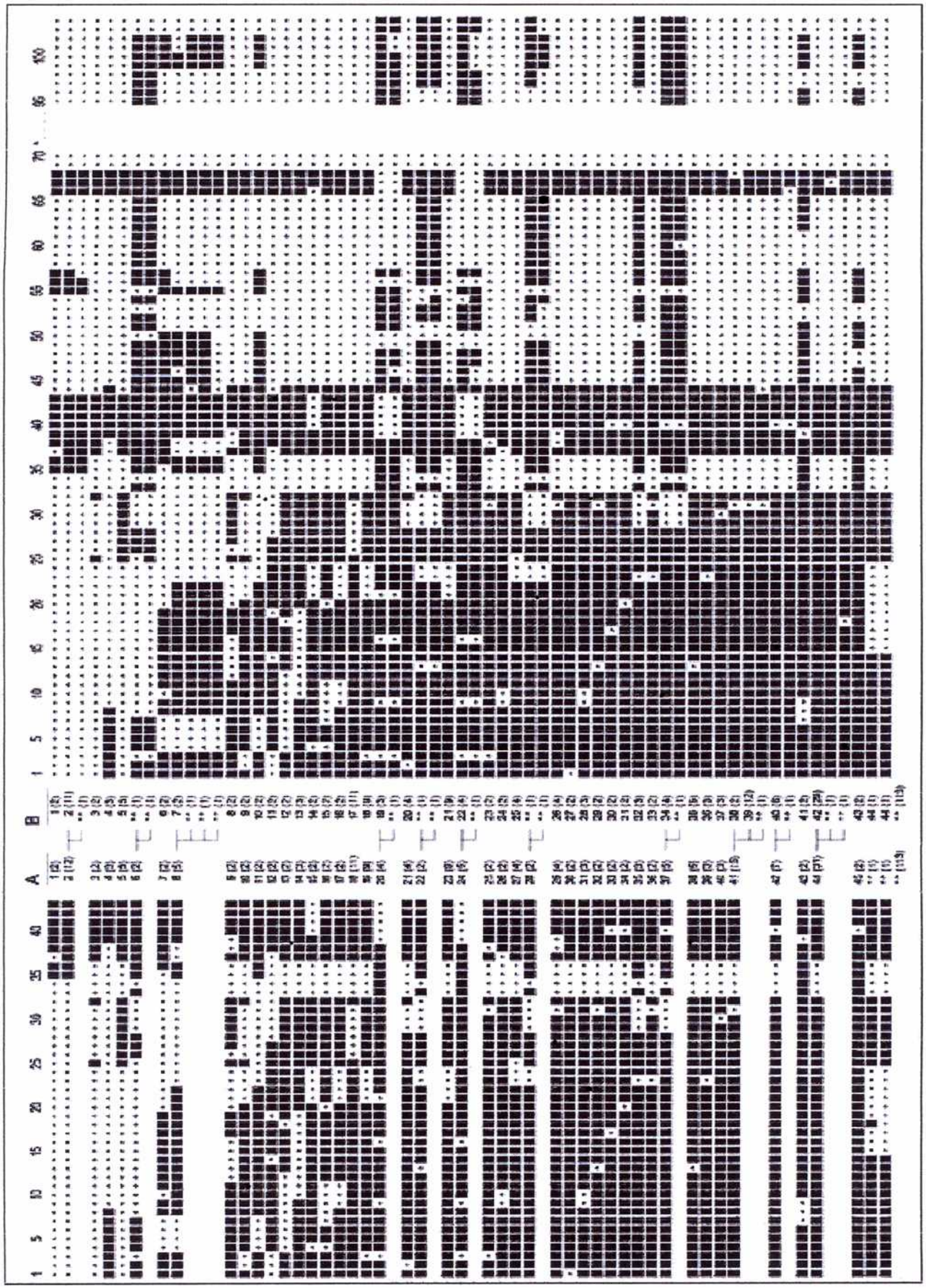


Figura 6. Ejemplo de spoligotyping de nueva generación (Los sps. 71 al 94 se omitieron debido a que corresponden a sps de *M. canetii*). Los Nros. superiores indican cada espaciador. Los Nros. laterales indican las cepas. Nro 1:*M. bovis* BCG, Nro 38 *M. tuberculosis* H37Rv, los demás corresponden a aislamientos bovinos argentinos de *M. bovis*.

7.1.7. Determinación del poder discriminatorio de los 104 espaciadores individualmente.

Finalmente y de manera de identificar espaciadores redundantes entre los 104 utilizados, se realizó un análisis en el que secuencialmente se omitió a cada uno de ellos y se evaluó si se obtenía el mismo poder discriminatorio es decir el mismo número de patrones distintos, en cada caso. Pudo determinarse que un total de 64 espaciadores incluyendo los 10 duplicados, pueden ser eliminados sin pérdida del poder discriminatorio logrado. En consecuencia 40 es el número mínimo de espaciadores para obtener el mismo grado de diferenciación. Entre estos 40 se encuentran tres de los espaciadores identificados en este trabajo. La lista es la siguiente según el orden genómico: 2, 3, 4, 12, 13, 18, 20, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 51, 52, 53, 62, 65, 1, 10, 45, 49, 50, 56, 66, 67, 68, 39, 5, 6 y 17.

Figura 7. (Página siguiente) Correlación entre spoligotipos obtenidos con la membrana de 43 (A) y 104 (B) espaciadores respectivamente. Los números entre paréntesis indican el número de aislamientos. *La señal de los espaciadores 71 a 95 fue negativa para todos los aislamientos. ** Spoligotipo con un único aislamiento.



7.2. Estudio genómico *in silico* de la Región DR en micobacterias no pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*

7.2.1. Identificación de genes marcadores flanqueantes a la Región DR.

Con el objeto de analizar el posible origen evolutivo de la Región DR en las micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*, en particular en *M. bovis*, se realizó un análisis comparativo *in silico* de los genes ubicados en las zonas flanqueantes a dicha región entre distintas micobacterias no pertenecientes al Complejo

Como primer paso se buscaron genes conservados en la región flanqueante a la Región DR en el genoma de *M. tuberculosis*, seleccionándose los siguientes genes: Rv2785c (*rpsO*), Rv2786c (*ribF*), Rv2790c (*ltp1*), Rv2793c (*truB*), Rv2800, Rv2825, Rv2828, Rv2831 (*echA16*), Rv2838 (*rbfA*) y Rv2845 (*proS*). La Región DR está ubicada en el genoma de *M. tuberculosis* entre los genes Rv2800 y Rv2825. Estos genes fueron descriptos como altamente conservados en distintas especies bacterianas, por ende se utilizaron como marcadores para la ubicación *in silico* de los correspondientes ortólogos en los genomas de *M. avium, M. smegmatis, M. marinum* y de *M. leprae,* con el objeto de identificar el locus donde deberían ubicarse secuencias similares a la Región DR en caso de estar presente.

Los resultados de las comparaciones por Blastp entre *M. tuberculosis* y las cuatro micobacterias estudiadas indicaron que muchos de estos genes marcadores se encuentran ubicados en la misma posición y orientación en los genomas de dichas bacterias. A primera vista aquellos que se encuentran entre los genes Rv2801 y Rv2824 de *M. tuberculosis,* carecen de ortólogos en *M. smegmatis* y en *M. avium* (Tabla 3). Esto se comprueba claramente al observar que la distancia entre el gen Rv2800 y el gen Rv2825, que en *M. tuberculosis* es de 24.5kb., en *M. avium* es de 2.2kb. al igual que en *M. smegmatis*, lo que indicaría que estos genes son exclusivos de *M. tuberculosis* Tabla 4 (Caimi y Cataldi, 2004).

M. tuberculosis	*M. smegmatis*		*M. avium*	
Gen	**Valor E**	**Posición[a]**	**Valor E**	**Posición[b]**
Rv2785c / *rps*O	2.3 e -38	150629	3.0e-31	3805416
Rv2786c / *rib*F	1.1 e -153	151723	4.8e-161	3806537
Rv2790c / *ltp*1	7.9 e-50 [1]	-	5.9e-189	3809914
Rv2793c / *tru*B	5.7e-106	155877	4.0e-108	3810970
Rv2800	7.7e-182	159842	1.9e-205,	3813339
Rv2801	2.6e-7 [1]	-	0.27	-
Rv 2802	ninguno	-	ninguno	-
Rv2803	0.31	-	ninguno	-
Rv2804c	0.00045	-	1	-
Rv2805	ninguno	-	0.51	-
Rv2806	0.37	-	2.7e-14 [4]	-
Rv2807	ninguno	-	ninguno	-
Rv2808	ninguno	-	0.018,	-
Rv2809	0.31	-	0.57	-
Rv2810c	1.1 e –18 [2]	-	ninguno	-
Rv2811	0.030	-	0.84	-
Rv2812	1.0 e –07 [2]	-	ninguno	-
Rv 2813	ninguno	-	3	-
Rv2817c	ninguno	-	ninguno	-
Rv2818c	ninguno	-	ninguno	-
Rv2819c	ninguno	-	ninguno	-
Rv2820c	0.59	-	ninguno	-
Rv2821c	ninguno		ninguno	-
Rv2822	ninguno		0.99	
Rv2823c	0.61		9.3	
Rv2824c	ninguno		ninguno	
Rv2825c	5.2e-59 [3]	162020	1.1e-72	3815567
Rv2827	0.21	-	0.85	-
Rv2828	1.7 e –67 [3]	162020	5.3e-73	3815567
Rv2829	0.15	-	0.14	-
Rv2830	0.2	-	0.24	-
Rv2831 *ech*A16	2.4e-87	162357	1.2e-110	3815922
Rv2836c *din*F	1.3 e -171		0.58	-
Rv2838c *rbf*A	2.0e-36	174879	7.2e-42	3818714
Rv2845c *pro*S	5.8e-257	ND	5.8e-257	3826596

Tabla 3. Similitud aminoacídica y posición genómica de los genes flanqueantes a la Región DR en *M. avium y M. smegmatis.* a: Posición en el contig 3315, b: Posición en el genoma; 1: Contig 3310; 2: Contig 3311; 3: Notar que Rv2825 (215aa) y Rv2828c (181 aa) son altamente similares; 4 localizado en la posición 2262112 en el genoma de *M. avium.*

Especie / Gen	*M. avium*		*M. tuberculosis*		*M .smegmatis*		*M. leprae*		*M. marinum*	
	Posición	**Delta (kb)[a]**	**Posición**	**Delta (kb)[a]**	**Posición**	**Delta (kb)[a]**	**Posición**	**Delta (kb)[a]**	**Posición**	**Delta (kb)[a]**
Rv2793/*tru*B	3810970		3102367		155877		1870999		405450	
Rv2800	3813339	2.4	3108416	6.0	159842	4.0	1874326	3.3	400324	5.1
Rv2825	3815567	2.2	3132895	24.5	162020	2.2	1875360	1.0	394676	5.6
Rv2831/*ech*A16	3815922	0.35	3135791	2.9	162357	0.33	1876260	0.9	392937	1.0
Rv2838/*rbf*A	3818714	2.8	3144623	8.8	174879	12.5	Invertido[b]		382741	10.2
Rv2845c/ *pro*S	3825596	6.8	3151205	6.5			1877242	1.0		

Tabla 4. Comparación entre las distancias de los marcos de lectura abiertos (MLAs) que flanquean a la Región DR. a: Distancia respecto del gen localizado previamente; b: Localizado río abajo del gen *pro*S en *M. leprae* (Caimi y Cataldi, 2004).

7.2.2. Comparación y análisis de las secuencias comprendidas entre los genes marcadores de las distintas micobacterias.

Debido a que el genoma de *M. avium* aún no se encuentra anotado, las regiones comprendidas entre *tru*B y *pro*S fueron localizadas mediante una búsqueda de texto en el archivo de texto de la secuencia completa de su genoma provista por el sitio TIGR. Las 20527 bases que corresponden a esta región, fueron escindidas mediante el uso de un archivo de texto y se analizaron los MLAs través del programa Artemis. La misma estrategia se utilizó para *M. smegmatis* donde la secuencia de la región comprendida entre los genes *tru*B y *rbf*A (19002 bases) se ubicaron en el Contig 3315 provisto por el TIGR y se analizaron los MLAs del mismo modo que en el caso anterior. A cada uno se lo sometió a una búsqueda de similitud por Blast contra el genoma de *M. tuberculosis.* Este análisis arrojó como resultados que los genes ortólogos a Rv2800 y Rv2825 de *M. tuberculosis* se encuentran adyacentes en *M. avium* y en *M. smegmatis*, lo que indica que los genes comprendidos entre el Rv2801 al Rv2824 no se encuentran presentes en esta región en estas dos especies Figura 8. Esto implica que una región de alrededor de 24.5kb estaría ausente en ambas especies. Cuando se examinó en detalle los genes Rv2800 y Rv2825 en *M. avium* se

observó que ambos genes se solapan unas 41pb, y lo mismo sucede en *M. smegmatis* donde se solapan 23pb. Adicionalmente se observó que Rv2825 de *M. avium* es más largo que en *M. smegmatis* y en *M. tuberculosis*.

Por otra parte el genoma completo de *M. leprae* se encuentra anotado, haciendo más sencillo el análisis de la región estudiada. Los genes ortólogos al Rv2800 y al Rv2825 de *M. tuberculosis* se denominan ML1550 y ML1551 en *M. leprae* respectivamente. Ambos son pseudogenes y se hallan divergentemente transcriptos al igual que en las demás especies analizadas. Figura 8.

Finalmente en *M. marinum* entre los ortólogos a *M. tuberculosis* Rv2800 y Rv2825 (Figura 8), se encuentra un solo gen que presenta una limitada similitud con el gen *ots*B1 que codifica para una probable treholasa-6-fosfatasa en *Streptomyces lavendulae*. En *Streptomyces coelicolor* no existen ortólogos a los genes Rv2800, Rv2813, Rv2816 y Rv2825 y a su vez se encontró que los genes *tru*B y *rbf*A se encuentran adyacentes entre sí.

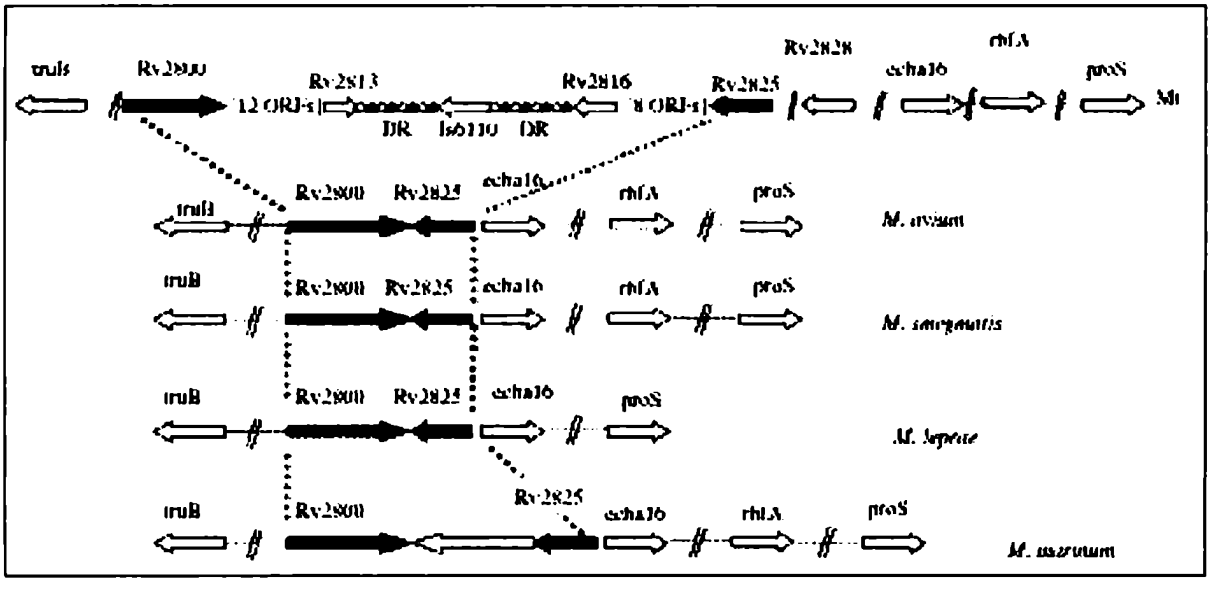


Figura 8. Comparación de la ubicación de los genes flanqueantes a la Región DR en el Complejo *M. tuberculosis* y en otras micobacterias (Caimi y Cataldi, 2004)

7.2.3. Confirmación *in vitro* de los resultados obtenidos *in silico.*

Los resultados obtenidos por el análisis *in silico* de los genomas se confirmaron por PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores dirigidos contra los genes Rv2800 y Rv2825 de *M. avium* y de *M. smegmatis.* Los amplicones obtenidos fueron del tamaño esperado en ambos casos, alrededor de 1kb. en *M. avium* y de 0.55kb para *M. smegmatis.* Como era de esperar no se observa amplificación para *M. tuberculosis* debido a que los sitios de hibridación de ambos oligonucleótidos se encuentran demasiado separados entre sí, por ende la amplificación en estas condiciones no es posible Figura 9.

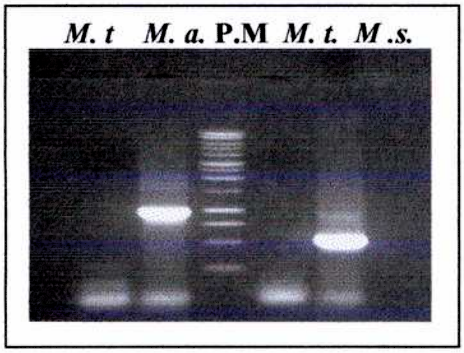


Figura 9. Amplificación de la Región DR en *M. avium (M. a), M. smegmatis (M. s) y M. tuberculosis (M. t)* P.M.: 1Kb. Promega

Con el objeto de realizar un análisis comparativo de la distribución de los genes flanqueantes a la región DR, las amplificaciones por PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores anteriores, se extendieron a otras micobacterias pertenecientes y no pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis.* Los resultados obtenidos sólo fueron positivos para *M. smegmatis* y en *M. avium* respectivamente, si bien se trabajó con bajas temperaturas de hibridación en los programas de PCR usados para aumentar la probabilidad de amplificación positiva.

Una última observación que se desprende del análisis de cada MLA de la región estudiada, indica que el gen Rv2813 de *M. tuberculosis* adyacente a la región DR es altamente similar (e-117, 245/270 aminoácidos idénticos) a una proteína putativa codificada en un plásmido presente en *M. celatum* denominado pCLP (Picardeau y Vincent, 1998;

Picardeau *et al*, 2000; Le Dantec *et al*, 2001). Dicho plásmido presenta dos repeticiones en tandem de 18pb. cada una, sugiriendo la posibilidad que la región DR haya surgido a partir de un plásmido micobacteriano presente en un ancestro común a ambas bacterias, dado que una repetición directa de la región DR posee 36pb, es decir exactamente el doble de las repeticiones en pCLP. Esquema 2

DR:	5'GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAAC3'	36pb	*M. tuberculosis*
pCLP	5'TCCGAAACCCGCTTAGCG3' 5'TCCGAAACCCGCTTAGCG3'	2X 18pb	*M. celatum.*

Esquema 2. Comparación entre la región DR de *M. tuberculosis* y la repetición directa en tandem de *M. celatum.*

7. RESULTADOS

PARTE II: Genómica comparativa en el Complejo *M. tuberculosis*

7.3. Comparación de los genomas completos del Complejo *M. tuberculosis*

Como se mencionó previamente en la Introducción de este trabajo, la genómica comparativa se desarrolló debido a la secuenciación completa de distintos genomas bacterianos, en particular de interés aquí, los genomas de *M. tuberculosis* y de *M. bovis*. El análisis detallado de la secuencia y las comparaciones establecidas a través del uso de distintas metodologías han permitido un conocimiento global de la fisiología de estos dos importantes patógenos.

7.3.1.Comparación por microarreglos genómicos.

La utilización de microarreglos ha provisto el medio adecuado para la comparación genómica completa, tanto entre cepas pertenecientes a la misma especie como así también entre especies íntimamente relacionadas entre sí. En esencia el ADN genómico de una cepa o especie de interés es hibridizado al microarreglo genómico que representa el genoma completo de la cepa de referencia y analizado para determinar si existen diferencias entre ambos. En general, en las micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*, estas diferencias se deben a deleciones de un genoma respecto del otro, siendo el genoma de *M. tuberculosis* el de mayor tamaño respecto de las demás especies relacionadas del Complejo. Este análisis tiene el potencial de proveer información acerca de la evolución de las micobacterias, la transferencia horizontal de material genético, la especiación y en el caso de las micobacterias patógenas, las bases genéticas de las variaciones en la virulencia (Pym y Brosch, 2000)

En consecuencia el objetivo de esta segunda parte del trabajo fue establecer posibles diferencias genéticas entre diferentes especies del Complejo *M. tuberculosis*, a través del uso de distintos tipos de microarreglos genómicos.

7.3.1.1. Genómica comparativa entre *M. tuberculosis* y *M. microti.*

El primer tipo de hibridación a microarreglo genómico se realizó utilizando distintos aislamientos de *M. microti*. Esta especie fue elegida entre los demás miembros del Complejo, debido a que ha sido descripta como agente causal de la tuberculosis en un roedor silvestre denominados "*vole*", pero como avirulenta para humanos, para el ganado en general y para animales de laboratorio, por este motivo se la propuso como vacuna atenuada contra la tuberculosis siendo utilizada en distintos protocolo en Europa en la década del 60 (Hart y Sutherland, 1977). Si bien *M. microti* probó ser una vacuna segura, los niveles de protección alcanzado con esta especie no fueron superiores a los observados a través del uso de *M. bovis* BCG, por lo cual se abandonó su utilización.

Por otra parte y de manera más importante en los últimos años se han descripto casos de tuberculosis asociados a *M. microti* en pacientes tanto inmunocompetentes, como inmunosuprimidos (van Soolingen *et al*, 1998; Niemann *et al*, 2000).

Por estos motivos es que se considera válida la elección de este bacilo para la comparación genómica con otros miembros del complejo a fin de establecer posibles diferencias genéticas que permitan explicar las características fenotípicas observadas en esta micobacteria.

Se eligieron tres cepas distintas de *M. microti* que fueron aisladas de humanos inmunodeprimidos donación del Dr. Dick van Soolingen de Holanda, quien caracterizó los aislamientos empleando distintos tipos de métodos de tipificación, en particular el spoligotyping. Las cepas seleccionadas poseen spoligotipos diferentes (van Soolingen *et al*, 1998), lo que motivó la elección de las mismas para la hibridación a los microarreglos.

En este caso se utilizó un tipo de microarreglo genómico que posee todos los MLAs anotados presentes en el genoma de la cepa de referencia secuenciada *M tuberculosis* H37Rv.

En la Tabla 5 se pueden ver los datos arrojados luego de la realización y análisis de los microarreglos con cada una de las cepas de *M. microti*. El estudio permitió confirmar deleciones previamente caracterizadas con otros métodos, algunas presentes en otros miembros de Complejo *M.tuberculosis* y otras deleciones específicas de *M. microti*. Cuatro de esas regiones (RD7, RD8, RD9, RD10) están ausentes en *M. bovis* y en *M. bovis* BCG (Gordon *et al*, 1999b), otra corresponde a un profago (RD3), y tres más (RD1mic , MiD1 y MiD3) son deleciones específicas de *M. microti* que han sido ya descriptas (Brodin *et al*, 2002). Las regiones MiD2 y RD5mic descriptas por Brodin y col. están deletadas en los aislamientos de vole, pero están presentes en las cepas de *M. microti* estudiadas aquí. (Tabla 5, En amarillo y celeste respectivamente).

La nueva deleción en *M. microti* respecto de *M. tuberculosis* encontrada en este trabajo, se denominó MiD4 (García-Pelayo *et al*, 2004) de acuerdo a la nomenclatura establecida previamente por Brodin y col. (Brodin *et al*, 2002) (Tabla 7, En naranja).

La distribución de las deleciones en el genoma de *M. microti* muestran que 5 de las 11 deleciones están ubicadas en un cuadrante de 3.4Mb a 4.4Mb. mientras que una región de 0.3 a 1.8Mb. no presenta ningún tipo de deleciones. Figura 10.

		Cepa de *M.microti*					Cepa de *M.microti*		
Region	**Gen**	**2272**	**1204**	**1206**	**Region**	**Gen**	**2272**	**1204**	**1206**
RD3	Rv1573	-	-	-	RD1^{mic}	Rv3864	-	-	-
	Rv1574	-	-	-		Rv3865	-	-	-
	Rv1575	-	-	-		Rv3866	-	-	-
	Rv1576c	-	-	-		Rv3867	-	-	-
	Rv1577c	-	-	-		Rv3869	-	-	-
	Rv1578c	-	-	-		Rv3868	-	-	-
	Rv1579c	-	-	-		Rv3870	-	-	-
	Rv1580c	-	-	-		Rv3871	-	-	-
	Rv1581c	-	-	-		Rv3872	-	-	-
	Rv1582c	-	-	-		Rv3873	-	-	-
	Rv1583c	-	-	-		Rv3874	-	-	-
	Rv1584c	-	-	-		Rv3875/esat6	-	-	-
	Rv1585c	-	-	-		Rv3876	-	-	-
	Rv1586c	-	-	-	RD5^{mic}	Rv2348c	+	+	+
RD7	Rv1964	-	-	-		Rv2349c/plcC	+	+	+
	Rv1965	-	-	-		Rv2350c/plcB	+	+	+
	Rv1966/mce3	-	-	-		Rv2351c/plcA	+	+	+
	Rv1967	-	-	-		Rv2352c	+	+	+
	Rv1968	-	-	-	MiD1	Rv2816c	-	+	+
	Rv1969	-	-	-		Rv2817c	-	+	+
	Rv1970/lprM	-	-	-		Rv2818c	+	+	+
	Rv1971	-	-	-		Rv2819c	+	+	+
	Rv1972	-	-	-	MiD2	Rv3187	+	+	+
	Rv1973	-	-	-		Rv3188	+	+	+
	Rv1974	-	-	-		Rv3189	+	+	+
	Rv1975	-	-	-		Rv3190c	+	+	+
	Rv1976c	-	-	-	MiD3	Rv3345c	-	-	-
	Rv1977	-	-	-		Rv3346c	-	-	-
RD8	Rv3617/ephA	-	-	-		Rv3347c	-	-	-
	Rv3618	-	-	-		Rv3348	-	-	-
	Rv3619c	-	-	-		Rv3349c	-	-	-
	Rv3620c	-	-	-		Rv1894c	-	-	-
	Rv3621c	-	-	-		**Rv3018**	-	-	-
	Rv3622c	-	-	-	**MiD4**	**Rv3019c/esXR**	-	-	-
RD9	Rv2072c/cobL	-	-	-		**Rv3020c/esxS**	-	-	-
	Rv2073c	-	-	-		**Rv3021c**	-	-	-
	Rv2074	-	-	-		**Rv3022c**	-	-	-
	Rv2075c	-	-	-					
RD10	Rv0221	-	-	-					
	Rv0222/echA1	-	-	-					
	Rv0223c	-	-	-					

Tabla 5. Resultados obtenidos por microarreglos de ADN en las cepas de *M. microti*

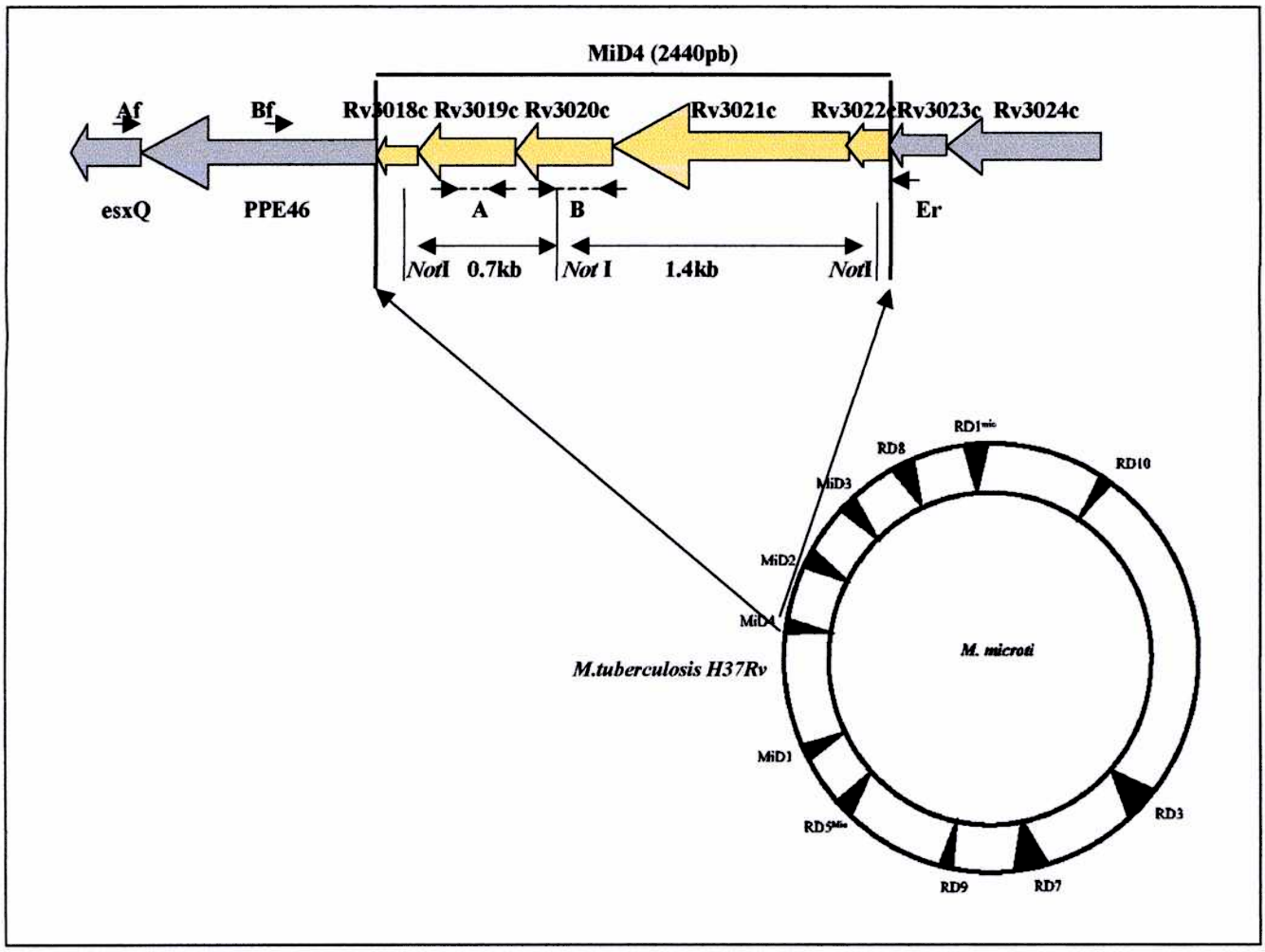


Figura 10. Esquema de la deleción MiD4 de *M. microti,* donde se indican los MLAs que abarca la deleción, la posición de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la amplificación y posterior secuenciación, y los sitios de corte de la enzima utilizada en los ensayos de Southern Blot. A: Sonda Rv3019c . B: Sonda Rv3020c.

7.3.1.2. Caracterización de la Región MiD4 de *M. microti.*

La caracterización de la región de la deleción MiD4 de *M. microti* se realizó a través de amplificación por PCR en y posterior secuenciación. Se diseñaron oligonucleótidos flanqueantes a MiD4 a partir de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* y se amplificó con dichos oligonucleótidos iniciadores para obtener a partir de la secuenciación de este producto la zona exacta donde se encuentra la deleción y el tamaño que abarca. La secuencia completa mostró que la deleción comprende 2.44kb. y que la ubicación exacta se encuentra entre las bases 3.378.269 y 3.380.709 respecto del genoma de *M. tuberculosis.* La

deleción incluye cinco MLAs: PPE48, PPE47, PPE27A que pertenecen la familia de proteínas PPE mientras que los otros dos genes Rv3019c y Rv3020c corresponden a los genes *esx*R y *esx*S respectivamente, que codifican para 2 proteínas pertenecientes a la familia de proteínas ESAT6. (Figura 10). La secuencia de esta zona fue exactamente igual en las tres cepas de *M. microti* analizadas, lo que indicaría que esta deleción podría haber surgido en un ancestro común a las tres cepas.

7.3.1.3. *Southern blots*

Se realizaron ensayos de *Southern blot* para confirmar los datos obtenidos por microarreglos genómicos. Se sintetizaron oligonucleótidos iniciadores internos a los genes Rv3019c y Rv3020c y el producto de amplificación de *M.tuberculosis* fue utilizado como sonda sobre ADN digerido por NotI de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. pinnipedii* y los tres aislamientos de *M. microti*. En la Figura 11 se muestran los resultados de dichos *Southern blots*, donde para ambas sondas, Rv3019 y Rv3020, puede verse la presencia de bandas de hibridación en el ADN genómico de *M. tuberculosis* y *M. bovis* y no así en ADN genómico *M. microti* lo que confirma los resultados encontrados en los microarreglos. En estos experimentos se incluyó en la membrana, ADN genómico de *M. pinnipedii* con el objeto de comprobar si la deleción hallada en *M. microti* estaba también presente en esta especie. La ausencia de banda de hibridación con ambas sondas sugiere que dichos genes están también ausentes en *M. pinnipedii*. Este resultado fue confirmado posteriormente por la misma estrategia de secuenciación del locus genómico correspondiente, encontrándose que la zona adyacente a la deleción es exactamente la misma que para *M. microti*. Figura 11

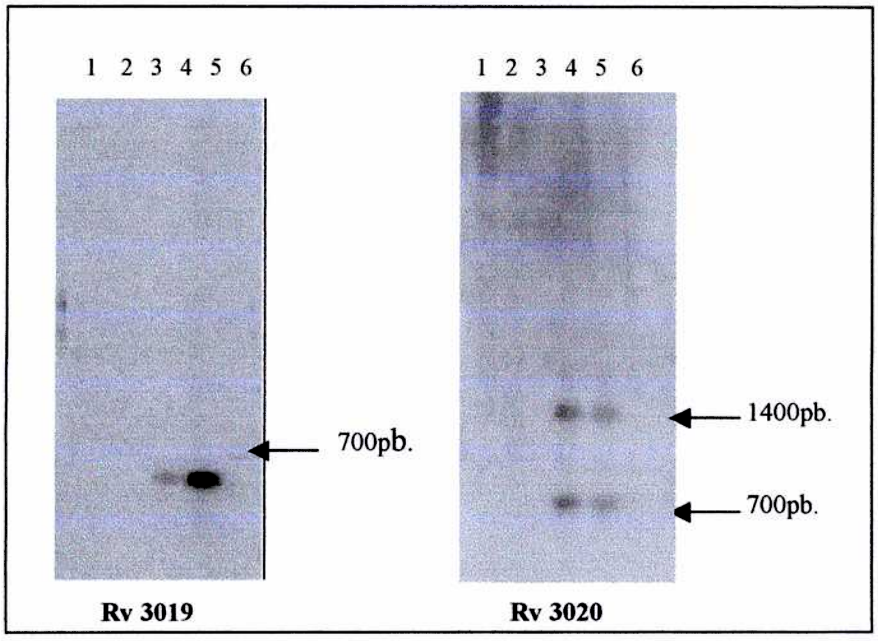


Figura 11. *Southern Blot* utilizando sondas internas dirigidas a los genes Rv3019c y Rv3020c. Los distintos ADN genómicos fueron digeridos por *Not*I (Figura 10). Líneas 1, 2 y 3: *M. microti* ; Línea 4: *M. tuberculosis*, Línea 5: *M. bovis* y Línea 6: *M. pinnipedii* .

7.3.2.1. Genómica comparativa de *M. pinnipedii.*

La elección de *M. pinnipedii* se debió a que este bacilo fue primeramente aislado a partir de mamíferos marinos en las costas de Nueva Zelanda y Australia (Cousins *et al*, 1993) mientras que paralelamente se lo encontró en los mismos animales en las costas de nuestro país (Romano *et al*, 1995, Bernardelli *et al*, 1996) A partir de ese momento se han realizado diversos estudios, en particular en nuestro laboratorio, a fin de caracterizar este bacilo en función de sus características fenotípicas y genotípicas (Romano *et al*, 1995; Alito *et al*, 1999, Zumárraga *et al*, 1999a). Recientemente se ha demostrado la capacidad de este bacilo de provocar enfermedad inoculando animales de laboratorio (Cousins *et al*, 2003). Estos hechos y los aislamientos de este bacilo en un entrenador de lobos marinos en Australia afectados por la enfermedad (Thompson *et al*, 1993) y de ganado bovino en Nueva Zelanda (Cousins *et al*, 2003), sugieren que esta bacteria tendría, al igual que *M. bovis*, un amplio rango de hospedador.

Por consecuencia basándose en los estudios mencionados en estas micobacterias aisladas de mamíferos marinos (Pinípedos) se la ha propuesto como una nueva especie dentro del Complejo *M. tuberculosis* denominada *M. pinnipedii* (Cousins *et al*, 2003).

Por otra parte mediante el análisis detallado de tres aislamientos distintos provenientes de lobos marinos Brosch y col. describen que *M. pinnipedii* ha perdido las regiones de diferencia RD3, RD7, RD8, RD9 y RD10, pero conservan las regiones RD5, RD4 y RD6 que están ausentes en *M. bovis* (Brosch *et al*, 2002). Esto indica que en el genoma este bacilo habrían ocurrido diferentes eventos de deleción-inserción respecto del genoma de *M. bovis*, como resultado de estas observaciones Brosch y col. han propuesto un nuevo escenario evolutivo del Complejo M. tuberculosis donde *M. pinnipedii* estaría ubicada más cerca de *M. microti* que de *M. bovis*.

Paralelamente los resultados descriptos en el punto anterior de este trabajo muestran que *M. pinnipedii* presenta la deleción MiD4 de *M. microti* (García-Pelayo *et al*, 2004), lo que apoya las observaciones realizadas por Brosch y col, en función del origen evolutivo de este bacilo.

Los microarreglos utilizados difieren a los usados para *M. microti*, debido a que contienen además de todos los MLAs anotados de *M. tuberculosis* H37Rv, también los de *M. tuberculosis* CDC1151 y a su vez posee los MLAs anotados que difieren por previo análisis genómico entre ambas *M. tuberculosis* secuenciadas y la cepa de referencia *M. bovis* AF2122/97. La elección de éste último tipo de microarreglo se debió a que la presencia de más de un tipo de ADN genómico fijado en el microarreglo permite aumentar la posibilidad de detectar diferencias entre los ADN que se hibriden y paralelamente contar con mayor número de controles internos.

Se comparó ADN genómico de la cepa M. bovis AF2122/97 con el de tres aislamientos argentinos de *M pinnipedii* provenientes de lobos marinos (Zumárraga *et al*, 1999a). Como en el caso de *M. microti* las cepas fueron caracterizadas por distintos métodos

de tipificación. A diferencia de las cepas de *M. microti*, las cepas de *M. pinnipedii* presentan un spoligotipo idéntico.

Los datos arrojados por la hibridación a los microarreglos permitieron identificar cinco deleciones presentes en el genoma de *M. pinnipedii*. Estas deleciones incluyen las denominadas RD3 y MiD3 previamente descriptas por Brosch y col. como ausentes tanto en *M. pinnipedii* como en *M. microti* (Brosch *et al*, 2002), la deleción descripta previamente en este trabajo de tesis: MiD4 (García-Pelayo *et al*, 2004 y Marmiesse *et al*, 2004), y por último dos nuevas deleciones específicas de *M. pinnipedii* que se denominaron PiD1 y PiD2 respectivamente (Tabla 6).

PiD1 incluye los genes Rv3530 y Rv3531c que codifica para una proteína hipotética de membrana, y PiD2 al gen Rv1978 que constituye el primer MLA de la región RD2 de *M. tuberculosis* ausente en *M. bovis* y al gen Rv1979 que constituye una posible permeasa. Los datos de los microarreglos indicaron a su vez que el gen Rv3531c (PiD1) y el gen Rv1978 (PiD2) estaban ausentes, es decir deletados en los tres aislamientos utilizados.

El análisis de los resultados obtenidos a partir del control realizado con la cepa de *M. bovis* AF2122/97 respecto de *M. pinnipedii*, permitieron identificar en *M. bovis* las deleciones previamente descriptas por Brosch y col.: RD4, RD5, RD6, RD11, RD12 y RD13 (Brosch *et al*, 2002). Por otra parte permitieron identificar nuevos MLAs ausentes en el cromosoma de esta cepa, aún no descriptos previamente en la bibliografía. En su mayoría dichas deleciones codifican para transposasas proteínas de las familias PE, PPE y PGRS y al gen Rv3888c, el cual codifica para una probable proteína conservada de membrana (Tabla 6).

Región	MLA/Nombre del gen	Presencia en *M. pinnipedii*	Posible función
RD3	Rv1573	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1574	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1575	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1576c	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1577c	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1578c	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1578c	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1580c	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1581c	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1582c	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1583c	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1584c	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1585c	-	Proteína relacionada a fago Rv1
	Rv1586c	-	Probable *integrasa*
MID3	Rv3345c/PE-	-	PE-PGRS
	PGRS50	-	Desconocida
	Rv3346c	-	PPE
	Rv3347c/PPE55	-	IS1608*
	Rv3348	-	IS1561*
	Rv3349c		
MiD4	Rv3018A/PE27A	-	PE
	Rv3019c/esxR	-	Familia ESAT-6
	Rv3020c/esxS	-	Familia ESAT-6
	Rv3021/PPE47	-	PPE
	Rv3022c/PPE48	-	PPE
PiD1	**Rv3530c**	-	**Posible oxidoreductasa**
	Rv3531c	-	**Proteína hipotética de membrana**
PiD2 (RD2*seal*)	**Rv1978**	-	**Proteína hipotética conservada**
	Rv1979	-	**Posible Permeasa conservada**
RD4	Rv1506c	+	Proteína hipotética
	Rv1507A	+	Proteína hipotética
	Rv1508	+	Proteína hipotética conservada
	Rv1509	+	Proteína hipotética
	Rv1510	+	Probable proteína de membrana conservada
	Rv1512	+	Probable epimerasa
	Rv1513	+	Proteína hipotética conservada
	Rv1515c	+	Proteína hipotética conservada
RD5	Rv2348c	+	Proteína hipotética
	Rv2349	+	Probable Fosfolipasa C 3 *plcC*
	Rv2352*	+	Probable PPE
RD6	Rv3424c	+	Proteína hipotética
	Rv3426*	+	Probable PPE
	Rv3427c*	+	Posible transposasa
	Rv3428c*	+	Posible transposasa
RD11	Rv2648*	+	Probable transposasa
	Rv2649*	+	Probable transposasa
	Rv2650c	+	Proteína relacionada a phi Rv2
	Rv2652c	+	Proteína relacionada a phi Rv2
	Rv2653c	+	Proteína relacionada a phi Rv2
	Rv2354c	+	Proteína relacionada a phi Rv2
	Rv2355c	+	Proteína relacionada a phi Rv2
	Rv2357	+	Proteína relacionada a phi Rv2
RD12	Rv3118	+	Proteína hipotética conservada *sseC1*
	Rv3120	+	Proteína hipotética conservada
	Rv3121	+	Probable citocromo p450 141 cyp141
RD13	Rv1255c	+	Probable proteína reguladora transcripcional
	Rv1256c	+	Probable citocromo p450 130 cyp130
	Rv1257c	+	Probable oxidoreductasa
	Rv3888c	+	**Probable proteína conservada de membrana**

Tabla 6. Deleciones encontradas a partir de las hibridaciones de *M. pinnipedii*. En negritas las deleciones encontradas en este trabajo.

7.3.2.2. Caracterización de PiD1 y PiD2 en *M. pinnipedii.*

Con el objeto de conocer la extensión exacta de las deleciones encontradas en *M. pinnipedii* se realizaron amplificaciones por PCR. (Figura 12). Se utilizaron oligonucleótidos iniciadores que flanquearan al gen Rv3531c (PiD1) (Figura 12 A) y al segmento Rv1978-Rv1979 (PiD2) (Figura 12 B). Las amplificaciones se realizaron sobre los mismos ADN genómicos utilizados para las hibridaciones a los microarreglos. La secuenciación de los productos de PCR obtenidos para los asilamientos de *M. pinnipedii*, permitieron determinar que PiD1 abarca 1298pb y PiD2 1942pb respectivamente.

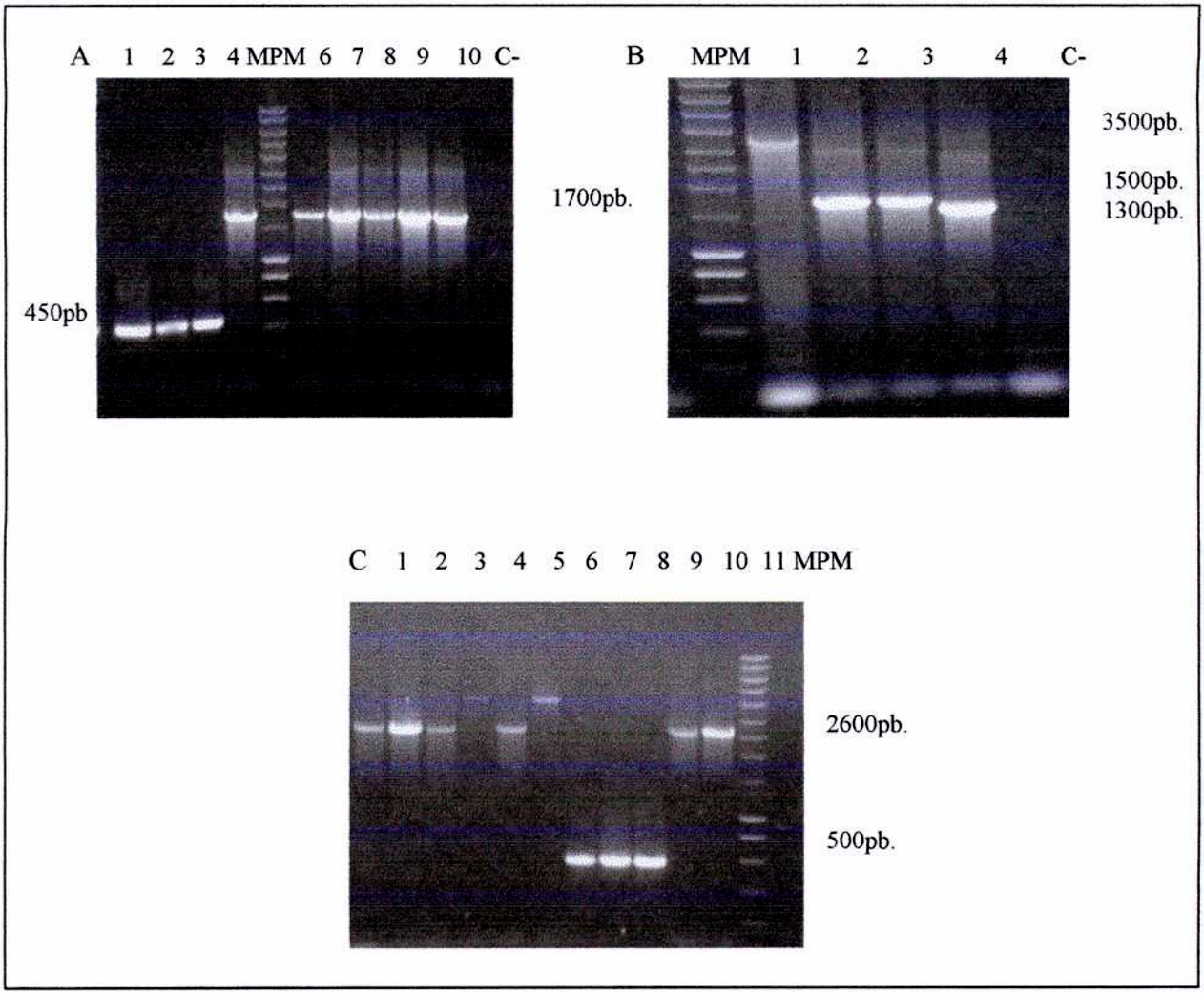


Figura 12. A: PiD1, Línea 1-3 *M. pinnipedii*, línea 4 *M. bovis* AF2122/97, línea 6 *M. tuberculosis* CDC1551, línea 7 *M. tuberculosis* H37Rv, línea 8 aislamiento de *M. bovis* subsp *caprae*, línea 9 *M. microti* 1207, línea 10 *M. microti* 1206; **B: PiD2**, línea 1 *M. bovis* AF2122/97, línea 2 y 3 aislamientos de *M. pinnipedii*, línea 4 *M. microti* 1206. **C: RD2mic**, Líneas 1-9 aislamientos de *M. microti* (1208, 1297, 2272, 15499, 1220, 15274, 15912, 1206, 1204), línea 10 *M. bovis* AF2122/97, línea 11 *M. bovis* subsp *caprae*. C-. Control negativo.

La posición exacta de ambas deleciones se mapeó respecto del genoma de *M. bovis* AF2122/97, determinándose que se encuentran en las posiciones 3,910,895-3,912,194 y 2,199,863-2,201,805 respectivamente. Asimismo la deleción PiD1 contiene 140pb. que corresponden al extremo 5′ del gen Rv3550c y la deleción PiD2 contiene 1169pb. del extremo 3′ del gen Rv1979. Las secuencias de las regiones adyacentes a ambas deleciones mostraron ser idénticas en los tres aislamientos estudiados, lo que indicaría al igual que en el caso de *M. microti*, que ambas deleciones podrían haber surgido en un ancestro común a dichos aislamientos. Los resultados obtenidos para PiD2 fueron confirmados al momento de la escritura de este trabajo por el grupo de Brosch y col. que denominó dicha región RD2 *seal* (Marmiesse *et al*, 2004)

La presencia de ambas deleciones fue analizadas en otras especies pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* mediante las amplificaciones por PCR mencionadas anteriormente (Figura 12 A y B). Los resultados indican que PiD1 es una deleción específica de *M. pinnipedii*, al contrario de lo que ocurre con PiD2 que cómo puede verse en la figura 12 B, también se encontraría en *M. microti*. Por este motivo se decidió secuenciar este producto para obtener la posición exacta de esta deleción en *M. microti*. Los resultados del análisis de la secuencia mostraron que esta la deleción de *M. microti* se encuentra en la posición 2,207,951-2,222,843 respecto del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y en la posición 2,199,586-2,201,759 respecto de *M. bovis* AF2122/97. Este segmento fue denominado RD2mic conforme a la nomenclatura actual (Brosch *et al*, 2002 y Marmiesse *et al*, 2004). RD2mic y PiD2 (RD2*seal*) comparten una zona de 1896pb. Para comprobrar si RD2mic se encuentra ausente en otros aislamientos de *M. microti* se realizaron amplificaciones por PCR utilizando un par de oligonucleótidos adicionales que hibridan a la zona flanqueante a la región comprendida por el Rv1977 y el Rv1979 (Figura 12 C). RD2mic resultó estar ausente en tres de los nueve aislamientos estudiados y presente en las demás especies analizadas.

En la Figura 13 pueden observarse las distintas deleciones, la posición de los oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones como aquellos utilizados para la obtención de las sondas en los experimentos de *Southern Blot.*

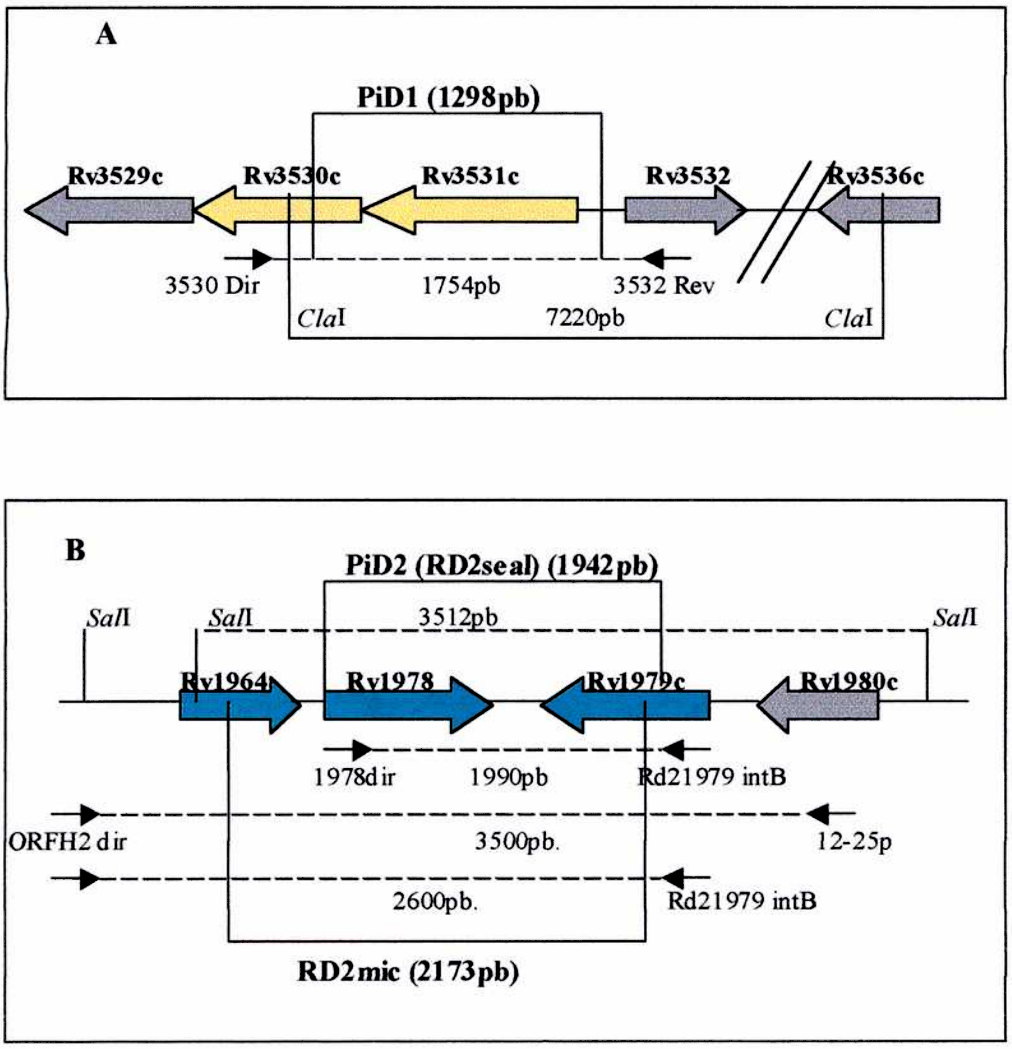


Figura 13. Esquema de las deleciones encontradas en *M. pinnipedii.* **A**: PiD1 **B**: PiD2 y RD2mic. Se muestran los sitios de corte de las enzimas y los sitios de unión de los oligonucleótidos iniciadores utilizados en las amplificaciones y las sondas para los experimentos de *Southern Blot.*

Por último la presencia o ausencia de las deleciones fueron confirmadas a través de experimentos de *Southern Blot* (Figura 14). Se utilizaron como sondas para estos ensayos los fragmentos de amplificación de las zona flanqueante a PiD1 y sondas dirigidas a zonas

internas tanto de PiD2 como de Rv3888c. Los ADN genómicos de las distintas especies utilizadas fueron digeridos con *Cla*I (PID1 y Rv3888) y *Sal*I (PiD2).

Mediante estos experimentos pudo confirmarse la presencia de PiD1 en los aislamientos de *M. pinnipedii* por observarse una banda de hibridación alrededor de 1.2kb más pequeña respecto de la observada en los demás ADN genómicos estudiados. (Figura 14 A I). El tamaño de esta banda fue consistente con los resultados obtenidos en las amplificaciones por PCR Asimismo consistentemente con las observaciones anteriores no se observaron bandas de hibridación cuando se utilizó la sonda dirigida contra Rv3888 en el ADN genómico correspondiente a *M. bovis* (Figura 14.A II) ni tampoco con la sonda dirigida contra el segmento Rv1978-Rv1979 en los ADN genómicos de *M. pinnipedii* (Figura 14 B). Los restantes ADNs genómicos presentaron las bandas de hibridación correspondientes a los tamaños esperados en cada caso.

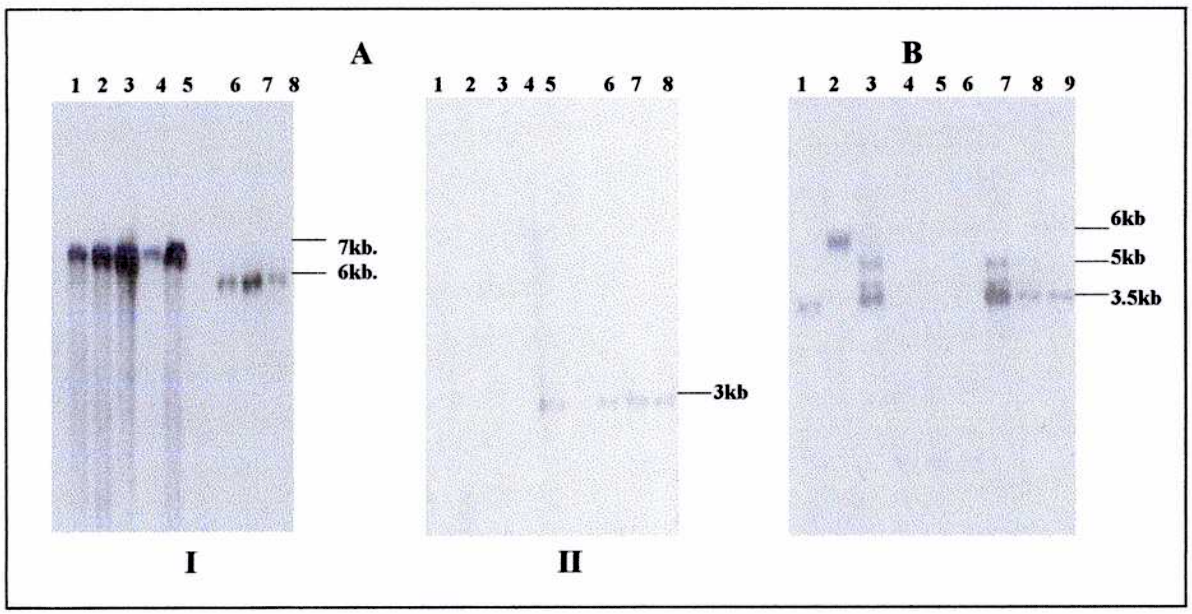


Figura 14: Análisis por *Southern blot* de la presencia de PiD1, PiD2 y Rv3888c entre distintas especies del Complejo *M. tuberculosis*. **A:** Línea 1 *M. tuberculosis* H37Rv, línea 2 *M. bovis* AN5, línea 3 a 5 aislamientos de *M. bovis*, líneas 6 a 8 aislamientos de *M. pinnipedii*. (**I**) Sonda: PiD1 (1754 bp). (**II**) Sonda: Rv3888c (192 bp). **B:** Línea 1 *M.bovis* AN5, línea 2 *M. tuberculosis* H37Rv, línea 3, 7 y 8 aislamientos de *M. bovis*, línea 4 a 6 aislamientos de *M. pinnipedii* y línea 9 *M. microti*. Sonda: PiD2 (1990 bp). A la izquierda de cada panel se muestran los tamaños de los pesos moleculares utilizados en kb.

7.4. Análisis bioinformático del genoma completo de *M. bovis*.

Con el objeto de profundizar en el conocimiento de las diferencias genéticas entre las especies relacionadas *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Se realizó una comparación de la secuencia completa de los genomas de las dos especies secuenciadas: *M. bovis* AF2122/97 y *M. tuberculosis* H37Rv. Este análisis se realizó mediante el programa Artemis (versión 4 para Macintosh) (Figura 15) En dichas comparaciones no se consideraron las diferencias descriptas previamente, la presencia de secuencias de inserción ya conocidas como la IS*6110*, los genes que codifican para la súper familia de proteínas PE y PE-PPE, los polimorfismos de nucléotido único (SNPs), haciéndose particular énfasis en aquellas regiones donde las secuencias presentaran posibles deleciones o inserciones de un genoma respecto del otro. El análisis de las comparaciones se realizó usando los programas Blast y MSPCrunch a nivel de la secuencia aminoacídica (Gordon *et al*, 2001a).

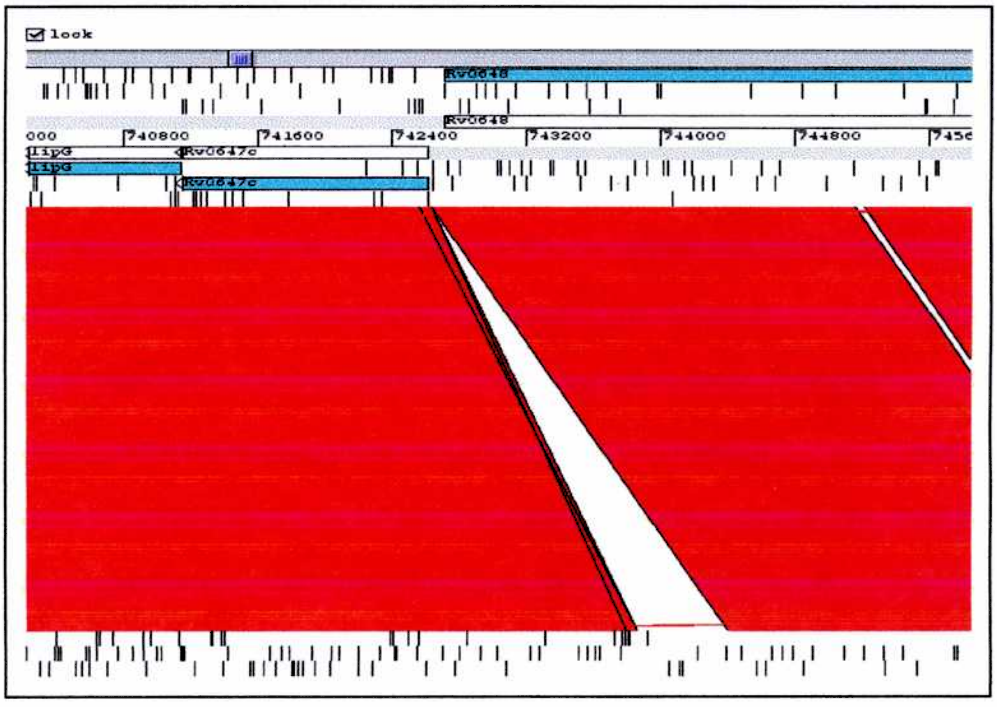


Figura 15. Ejemplo de ventana del programa Artemis. En la parte superior se observan algunos MLAs de *M. tuberculosis* H37Rv, en particular el gen Rv0647c (En celeste). En la parte superior los MLAs de *M. bovis* AF2122/97. La banda roja indica las secuencias compartidas por ambos genomas, donde la zona en blanco indica una diferencia, en este caso una inserción de *M. bovis* AF2122/97 respecto de *M. tuberculosis* H37Rv.

En la siguiente tabla (Tabla 7) se presentan la totalidad diferencias encontradas (exceptuando a la familia de proteínas PE/PPE), a través del uso del programa Artemis entre ambas bacterias. En amarillo se observan diferencias descriptas previamente, en celeste las no descriptas aún y en naranja las seleccionadas para posterior estudio.

Rv o gen	tipo de diferencia	Rv o gen	tipo de diferencia
71	puntual	1964-77	RD7
hyc Q	puntual	2023-2024	RvD1
pnt B	puntual	*pks* 12	varias mutaciones
147	puntual	*cob* I	puntual
176	puntual	2073-2075	RD9
lip W	puntual silenciosa	2082	varias mutaciones
0221-0223	RD10	2105-2106	IS*6110*
358	puntual silenciosa	2105-2107	IS*6110*
378	puntual	*suc* B	puntual
387	puntual silenciosa	acd6-2248	puntual
det-0430	puntual	2278-79	IS*6110*
493	puntual	2346-2355	RD5
538	puntual	*rne*	puntual
tcr A-602	puntual	2479-80	IS*6110*
613	puntual	*lpp* A-*lpp* B	duplicación génica
rec C	puntual	2560	puntual
0647-8	533pb adic. extremo 3´	2645-59	RD11
648	puntual	2709	puntual
rpl L	puntual	2731	puntual
770	puntual	2813-2816	Región DR
0795-0796	IS*6110*	2850	puntual
804	puntual	*pps* ABCD	varias mutaciones
pdc	puntual	*lig* B	puntual
rpf A	gen	3081	puntual
953	inserc. puntual en *M.t.*	3094	puntual
1004	puntual en dos loci	*sseC* 1-3121	RD12
pra	puntual	3175	puntual
1157	puntual	3184-87	IS*6110*
lpq W	puntual	3184-88	IS*6110*
1255-57	RD13	3333	puntual
pkn H	326/377 aa differ.	3365	puntual
1290	puntual	3380-81	IS*6110*
1363	puntual	3427-28	RD6
1369-1370	IS*6110*	3433	puntual
1506-1516	RD4	3439	puntual
1557-*mmp* L	TbD1	*rpo* Oa	intergenica
glg GY	RD17	3473-74	dos genes
nad B	puntual	3479	Deleción en *M.b.*
1610	puntual	3604	puntual
cyc A	puntual	*eph* A-*lpq* G	RD8
1756-7	IS*6110*	3657	puntual
1763-63	IS*6110*	3864	puntual
lpp D	puntual	3888	Deleción en *M.b.*

Gen	*M. tuberculosis* H37Rv	*M. bovis* AF2122/97	Características	Diferencia entre ambos genomas
Rv0867c, *rpf*A	1221pb (407aa)	984pb.	Posible promotor de resucitación celular	Gen funcional más pequeño en *M.bovis*
Rv3479	3225pb.	1300pb.	Función desconocida	Deleción de 714pb. en *M. bovis*
Rv0648	132pb.	665pb.	α-manosidasa	Inserción de 533pb *Mbovis*,
l*pp*A/B	1719pb.	2375pb.	Lipoproteínas de membrana	Duplicación génica de *lpp*A en *M .bovis*

Tabla 8. Características de los factores elegidos entre los que presentaron diferencias entre *M. bovis* AF2122/97 y *M. tuberculosis* H37Rv.

En la Figura 16 se muestra un esquema de los genes elegidos conforme a la posibilidad de ser utilizados como marcadores para distinguir entre ambas especies bacterianas. Se incluyeron dentro de los mismos dos factores previamente descriptos por ser considerados de interés de acuerdo al tipo de proteína codificada.

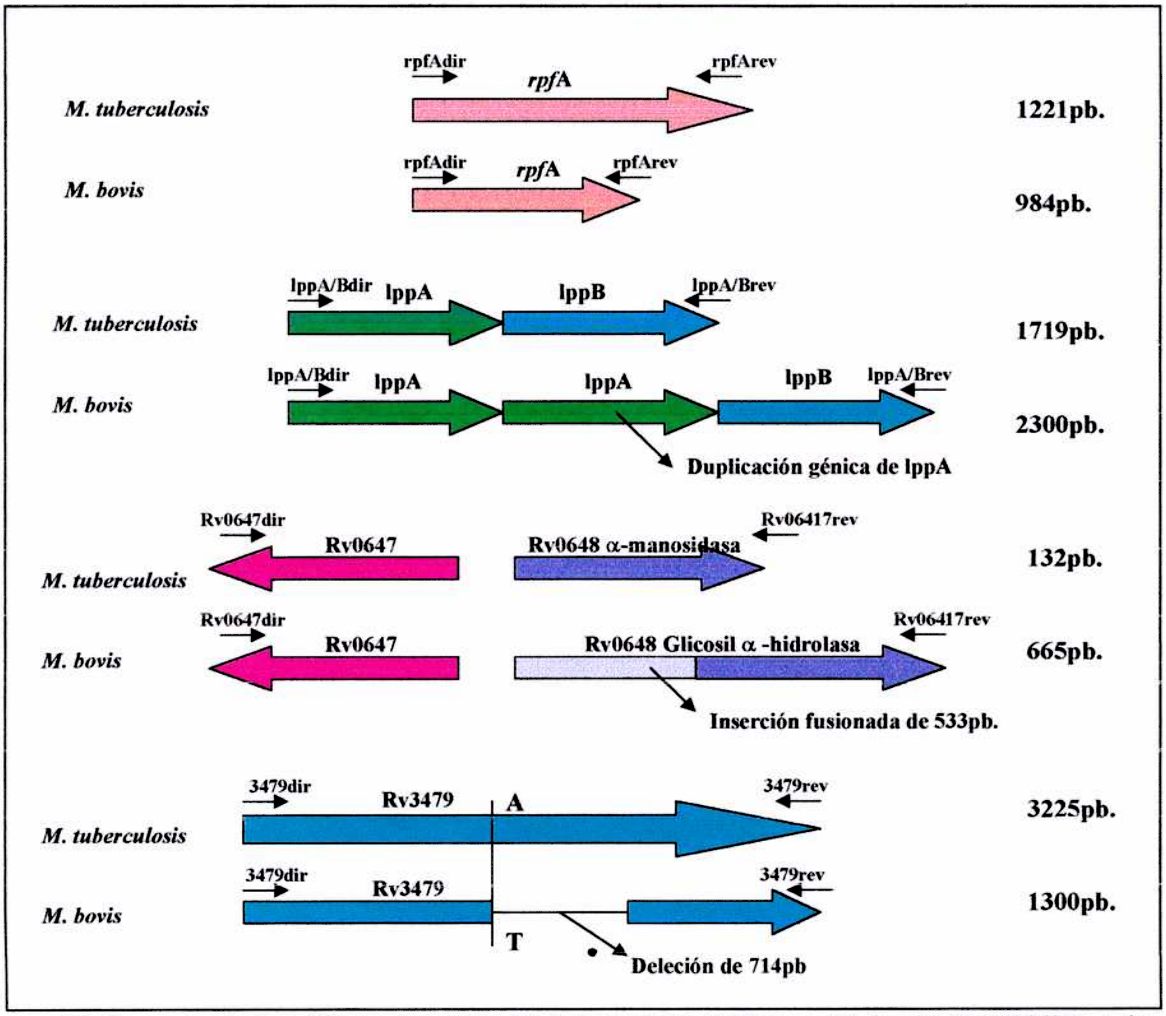


Figura 16. Esquema de las diferencias entre *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AF2122/97. A la derecha se observan los tamaños esperados por PCR. La posición de los oligonucleótidos iniciadores se indica con flechas negras.

7.4.1. Análisis *in vitro* de los genes hallados por bioinfomática.

Con el objeto de confirmar *in vitro* las diferencias encontradas entre ambos genomas a través del uso de herramientas bioinformáticas se aplicaron amplificaciones por PCR no sólo en las dos cepas analizadas *in silico*, sino que también se analizaron aislamientos locales tanto de *M. bovis* como de otros miembros del Complejo *M. tuberculosis*. Para la realización de este estudio se sintetizaron oligonucleótidos iniciadores a partir de la secuencia en el genoma de *M. tuberculosis* de cada gen elegido. La Figura 17 muestra dichas amplificaciones.

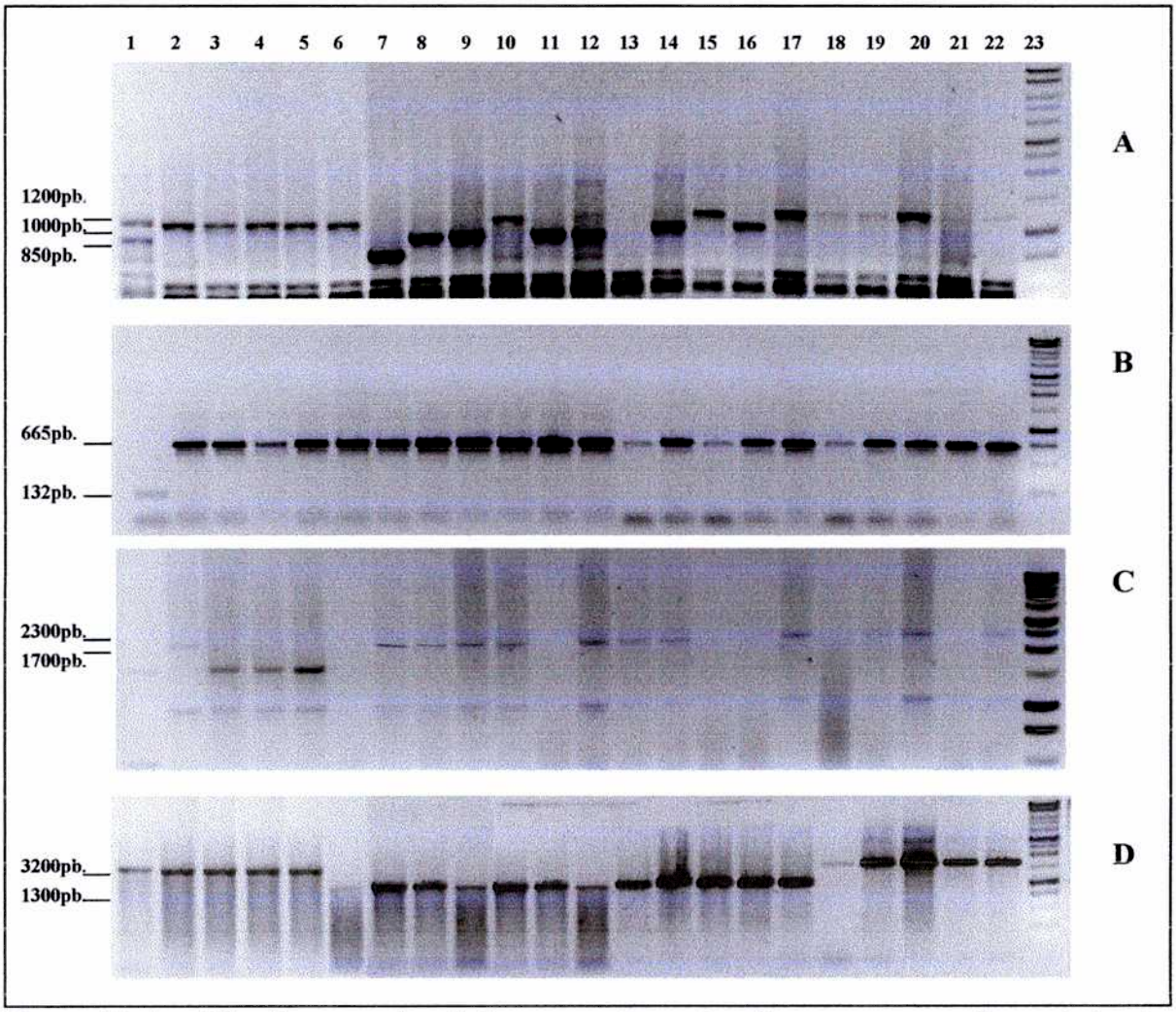


Figura 17. Amplificaciones con los distintos marcadores obtenidos por comparación genómica *in silico*. **Panel A**: *rpf*A, **Panel B**: Rv0647; **Panel C**: *lpp*A-B **Panel D**: Rv3479c. Línea 1: *M. tuberculosis* H37Rv; Línea 2: *M. tuberculosis* Cepa M; Línea 3: *M.bovis* BCG; Línea 4: *M. microti*; Línea 5: *M. pinnipedii*, , Líneas 6 a 17: Aislamientos de *M. bovis;* Línea 7: Aislamiento de *M. bovis* "1128"; Líneas 18 a 22 *M. bovis* subsp. *caprae* y Línea 23: MPM (1Kb., Promega)

Como muestra la Figura 17 para el caso del gen *rpf*A (Panel A), los resultados obtenidos muestran que, si bien se obtuvo en algunos aislamientos de *M. bovis* el tamaño esperado en la amplificación, se puede ver la presencia de polimorfismos en dichos aislamientos. Por otra parte algunos de estos los aislamientos de *M. bovis* presentan el mismo tamaño que para *M. tuberculosis* H37Rv. Estos resultados motivaron el análisis detallado de esta región para lo cual se secuenciaron los productos de amplificación de los aislamientos de *M. bovis* que presentaron los mencionados polimorfismos.

Los productos de amplificación en Rv0648 (Panel B) fueron de igual tamaño en todos los aislamientos analizados, solo se observa diferencia para m. tuberculosis H37Rv donde el producto de amplificación es de alrededor de 500pb. menor que en los demás obtenidos. Esto concuerda con el análisis realizado *in silico* y de acuerdo a estos resultados y teniendo en cuenta las regiones de diferencias previamente descriptas para *M. tuberculosis* H37Rv, podría considerarse a este marcador como una nueva región de las denominadas RvD (presentes en *M. bovis* y ausentes en *M. tuberculosis* H37Rv), aquí se propone denominarla RvD6 continuando con la nomenclatura actual.

Los productos de amplificación con *lpp*A (Panel C) presentaron mayor tamaño de amplificación para las cepas de *M. bovis*, las de *M. bovis* subsp. *caprae* y la cepa M de *M. tuberculosis*, respecto de *M. tuberculosis* H37Rv. *M. bovis* BCG, *M. pinnipedii*, *M. microti* presentaron un producto de amplificación de menor tamaño. No se observaron polimorfismos en las cepas de *M. bovis* analizadas. Estos resultados concuerdan con lo observado *in silico* respecto de la comparación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* H37Rv.

En cuanto al gen Rv3479c (Panel D) se obtuvo para todas los aislamientos de *M. bovis* estudiados, un producto de amplificación menor que para las demás especies analizadas. En este caso la diferencia también se observó para los aislamientos de *M. bovis* subsp. *caprae* y para *M. bovis* BCG. Tampoco se presentaron polimorfismos para este

marcador. Este marcador podría utilizarse para diferenciar de manera sencilla aislamientos de *M. bovis* respecto de *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. tuberculosis* y *M. bovis* subsp. *caprae*. Inclusive se podría utilizar este marcador para diferenciar fácilmente *M. bovis* BCG de *M. bovis* aunque debería extenderse el análisis a un número mayor de aislamientos

En suma de acuerdo a los resultados de las amplificaciones realizadas, se puede observar que entre los cuatro marcadores elegidos, el que mejor se presta para la diferenciación de *M. bovis* respecto de otras especies del Complejo es el gen Rv3479.

7.4.2. Análisis de los polimorfismos presentes en el gen *rpf*A en *M. bovis*.

Con el objeto de estudiar los polimorfismos encontrados en distintos aislamientos de *M. bovis* en el gen *rpf*A, se clonaron y secuenciaron las bandas de amplificación obtenidas para dichos aislamientos y las secuencias fueron analizadas a nivel aminoacídico.

La secuencia de la proteína RPFA en *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* CDC1551 presenta repeticiones aminoacídicas internas en la zona central de la misma. El motivo que se encuentra conservado consiste en 8 aminoácidos: APADLAPP. Existen 5 repeticiones perfectamente conservadas y 8 repeticiones degeneradas y de menor tamaño en esta proteína. Las repeticiones se encuentran separadas por tres conectores conservados Figura 18.

El análisis detallado de las secuencias permitió observar que existiría una sucesiva pérdida de material genético, donde un grupo de dos conectores y dos repeticiones conservadas se perdieron en la cepa *M. bovis* AF2122/97 y a su vez el conector restante y seis de las ocho repeticiones se perdieron en los aislamientos locales analizados. En la Figura 18 se pueden observar las comparaciones de las secuencias aminoacídicas señaladas.

```
M. tuberculosis H37Rv     1 MSGRHRKPTTSNVSVAKIAFTGAVLGGGGIAMAAQATAATDGEWDQVARC
M. bovis AF2122/97        1-MSGRHRKPTTSNVSVAKIAFTGAVLGGGGIAMAAQATAATDGEWDQVARC
M. bovis 1128             1-MSGRHRKPTTSNVSVAKIAFTGAVLGGGGIAMAAQATAATDGEWDQVARC

M. tuberculosis H37Rv    51-ESGGNWSINTGNGYLGGLQFTQSTWAAHGGGEFAPSAQLASREQQIAVGE
M. bovis AF2122/97       51-ESGGNWSINTGNGYLGGLQFTQSTWAAHGGGEFAPSAQLASREQQIAVGE
M. bovis 1128            51-ESGGNWSINTGNGYLGGLQFTQSTWAAHGGGEFAPSAQLASREQQIAVGE

M. tuberculosis H37Rv   101-RVLATQGRGAWPVCGRGLSNATPREVLPASAAMDAPLDAAAVNGEPAPLA
M. bovis AF2122/97      101-RVLATQGRGAWPVCGRGLSNATPREVLPASAAMDAPLDAAAVNGEPAPLA
M. bovis 1128           101-RVLATQGRGAWPVCGRGLSNATPREVLPASAAMDAPLDAAAVNGEPAPLA

M. tuberculosis H37Rv   151-PPPADPAPPVELAANDLPAPLGEPLPAAPADPAPPADLAPPAPADVAPPV
M. bovis AF2122/97      151-PPPAD--------------------------------LAPPAPAD-----
M. bovis 1128           151-------------------------------------------------V

M. tuberculosis H37Rv   201-ELAVNDLPAPLGEPLPAAPADPAPPADLAPPAPADLAPPAPADLAPPAPA
M. bovis AF2122/97      164----------------------------LAPPAPADLAPP-----------
M. bovis 1128           153-ELAVNDLPAPLGEPLPAAPADPAPPADLAPPAPADLAPPAPADLAPPAPA

M. tuberculosis H37Rv   251-DLAPPVELAVNDLPAPLGEPLPAAPAELAPPADLAPASADLAPPAPADLA
M. bovis AF2122/97      176------VELAVNDLPAPLGEPLPAAPAELAPPADLAPASADLAPPAPADLA
M. bovis 1128           183-DLAPP---------------------------------------------

M. tuberculosis H37Rv   301-PPAPAELAPPAPADLAPPAAVNEQTAPGDQPATAPGGPVGLATDLELPEP
M. bovis AF2122/97      221-PPAPAELAPPAPADLAPPAAVNEQTAPGDQPATAPGGPVGLATDLELPEP
M. bovis 1128           189-------------------AAVNEQTAPGDQPATAPGGPVGLATDLELPEP

M. tuberculosis H37Rv   351-DPQPADAPPPGDVTEAPAETPQVSNIAYTKKLWQAIRAQDVCGNDALDSL
M. bovis AF2122/97      271-DPQPADAPPPGDVTEAPAETPQVSNIAYTKKLWQAIRAQDVCGNDALDSL
M. bovis 1128           222-DPQPADAPPPGDVTEAPAETPQVSNIAYTKKLWQAIRAQDVCGNDALDSL

M. tuberculosis H37Rv   401-AQPYVIG
M. bovis AF2122/97      321-AQPYVIG
M. bovis 1128           273-AQPYVIG
```

Figura 18. Comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína RPFA entre *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AF2122/97 y un aislamiento de *M. bovis* "1128". En celeste se observan las repeticiones conservadas, en amarillo las repeticiones degeneradas y en rojo los conectores.

Discusión

8. DISCUSION

Desde su aislamiento por primera vez en 1882 (Koch, 1882), *Mycobacterium tuberculosis*, ha permanecido como un desafío continuo para los investigadores, entre otras características debido a su prolongado período de duplicación, los requerimientos para su crecimiento *in vitro* y el riesgo de contagio que implica su manipulación. Más de 100 años debieron pasar para que en el año 1998, momento en que es publicada la secuencia genómica completa de *M. tuberculosis* (Cole *et al*, 1998), se comience a comprender más profundamente la biología de éste importante patógeno.

A partir del inicio de los distintos proyectos de secuenciación genómica, en particular de los genomas de *M. tuberculosis* (Cole *et al*, 1998) y de *M. bovis* (Garnier *et al*, 2003) y como consecuencia de la construcción de las diferentes genotecas de BACs para éste propósito, surge la denominada genómica comparativa. Esta nueva disciplina que se basa principalmente en el uso de la bioinformática y de distintas técnicas de hibridación, ha permitido revelar las diferencias genéticas entre las micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*; dichas micobacterias comparten una tasa de homología a nivel nucleotídico del 99% (Gordon *et al*, 1999a), pero difieren en distintas características fenotípicas especialmente el rango de hospedador. A su vez esta disciplina ha determinado que los polimorfismos debidos a cambios en un solo nucleótido (SNPs) son poco frecuentes y los eventos que involucran deleciones e inserciones parecen ser la principal fuente de variabilidad del genoma. Por lo tanto la genómica comparativa sienta las bases para el conocimiento de la patogenia, rango de hospedador, virulencia en las micobacterias.

Por estos motivos el principal objetivo de la presente tesis fue aportar conocimientos más detallados con respecto a los genomas de las micobacterias responsables de enfermedades zoonóticas pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* a través de la

identificación y caracterización de distintas regiones genómicas. En particular se abarcaron los siguientes campos:

1) Estudio y caracterización detallada de la Región DR así como la utilización de los datos obtenidos para el mejoramiento de la técnica de tipificación más utilizada en *M. bovis*: el spoligotyping, y por otra parte la comparación de dicha región entre distintas especies de micobacterias permitió plantear una posible hipótesis para su origen evolutivo.

2) Aplicación de tecnologías derivadas directamente de la secuenciación de los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, (microarreglos genómicos, comparación de secuencias completas *in silico*) que permitieron identificar y caracterizar regiones no descriptas previamente.

Uno de los mayores desafíos a la hora de combatir la tuberculosis es controlar la transmisión de la enfermedad, en este sentido la tipificación molecular de aislamientos del Complejo *M. tuberculosis* es una herramienta que en la última década ha contribuido a la detección de brotes y al conocimiento de la transmisión de esta enfermedad. Actualmente las técnicas de genotipificación de ADN se están utilizando para la identificación de nuevos brotes y de nuevos grupos genotípicos, aportando datos que difícilmente se podrían obtener mediante la vigilancia epidemiológica convencional (Bifani *et al*, 1999).

Una de las maneras más eficaces de tipificar a las micobacterias pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, se basa en la determinación de la presencia-ausencia de espaciadores característicos de la región genómica denominada "Región DR" (Hermans

et al, 1991). Los polimorfismos presentes entre distintos aislamientos en dicha región han llevado al surgimiento de la técnica denominada Spoligotyping, la cual posibilitó la realización de estudios epidemiológicos que permiten conocer y proyectar el seguimiento de brotes en distintas regiones geográficas (Kamerbeek *et al*, 1997). Las técnicas utilizadas hasta ahora para la tipificación se basaban en la secuencia IS*6110* utilizada como sonda en ensayos de RFLP. Si bien ésta técnica es altamente discriminatoria, el método es complejo y requiere cultivo previo. El spoligotyping es una técnica de fácil y de rápida aplicación que presenta como una de sus ventajas importantes, el poder realizarse potencialmente a partir de muestras clínicas directamente, sin necesidad de cultivo previo, además posee gran capacidad discriminatoria entre aislamientos de *M. bovis*, a diferencia de lo que ocurre con la aplicación de RFLP/IS*6110* dado el bajo número de copias de IS6*110* en el genoma de *M. bovis*. Debido a estas razones ha sido de suma importancia el mejoramiento de su capacidad de diferenciación, objetivo para el cual es necesario conocer de manera detallada las características de la Región DR, especialmente en *M. bovis*.

En primer lugar se analizó la frecuencia de aparición de los distintos espaciadores empleados actualmente en la membrana de uso corriente, entre distintos aislamientos de *M. tuberculosis* y de *M. bovis*. Este análisis tuvo por objeto verificar el poder discriminatorio de cada espaciador. En el caso de *M. tuberculosis* se pudo observar que todos los espaciadores aparecen en una frecuencia similar, motivo por lo cual la capacidad discriminatoria de los mismos dentro de esta especie no difiere demasiado. El caso contrario ocurre en *M. bovis* donde existe una marcada diferencia entre la frecuencia de aparición de espaciadores pertenecientes al extremo 3′ de esta región, lo que hace a dichos espaciadores mejores candidatos en la diferenciación de los aislamientos, no así los espaciadores del extremo 5′, los cuales son más abundantes entre todas las cepas, haciéndolos menos indicados para la diferenciación (Caimi *et al*, 2001). De acuerdo a estos resultados se podría esperar que la frecuencia de aparición de cada espaciador fuera independiente, es decir que cada uno

tuviera una frecuencia distinta de los demás, lo que permitiría aumentar el grado de diferenciación en distintos aislamientos de distintas especies.

La mayoría de las cepas de *M. bovis* tipificadas en el laboratorio carecen de varios espaciadores (Zumárraga *et al*, 1999b), estos espaciadores faltantes aparecen como una zona de falta de hibridación en los patrones de spoligotyping. Como segundo punto entonces y para determinar si estas zonas hay nuevos espaciadores, son meras deleciones de unidades DR–espaciador o cuentan con espaciadores mutados o no descriptos, dichas regiones fueron amplificadas utilizando oligonucleótidos iniciadores que hibridizan a los espaciadores adyacentes a la zona de falta de hibridación. Los fragmentos resultantes fueron clonados y posteriormente secuenciados. A partir de dichas secuencias pudieron ser identificados cinco espaciadores nuevos. No se observaron, espaciadores mutados, y solamente en un caso se observó un espaciador repetido. Los espaciadores nuevos estaban presentes en el 50% de los aislamientos de *M. bovis* y solo en el 8% de las cepas de *M. tuberculosis*, con la excepción del espaciador 1453, el cual estaba presente en el 70% de las cepas de *M. tuberculosis* estudiadas. Es interesante mencionar que dicho espaciador fue el único encontrado a partir del aislamiento de *M. pinnipedii* utilizado, siendo los restantes hallados a partir de las cepas de *M. bovis*. El hecho de que ciertos espaciadores hayan sido encontrados más frecuentemente o que sean exclusivos de una determinada especie, corrobora la observación previa de que los espaciadores 3, 9, 16, y 39 al 43, se encuentran siempre ausentes en las cepas de *M. bovis*. En este trabajo, la ausencia de un nuevo espaciador fue determinada por la ausencia de amplificación. No solo la ausencia de nuevos espaciadores podría explicar la amplificación negativa observada, sino que otra razón podría ser que el elemento IS*6110* estuviera invertido en la cepa analizada. A pesar de ello, se considera que esta no es la explicación más acertada debido a que en muchos de los casos la misma cepa en la que se observó amplificación negativa, dio como resultado amplificación positiva con otro par de oligonucleótidos iniciadores, lo que significa que la orientación de IS*6110* no

estaba invertida. Por otra parte se demostró que al igual que los espaciadores descriptos previamente, los nuevos identificados en este trabajo poseen un orden y secuencias conservadas, a su vez, los espaciadores repetidos se presentan en tandem respecto del espaciador original como ocurre con los espaciadores previamente descriptos.

En concordancia con el objetivo de esta parte del trabajo, aislamientos pertenecientes al patrón A, es decir el spoligotipo 34 mayoritario de los aislamientos de *M. bovis* en Argentina (Zumárraga *et al*, 1999b), fueron empleados para observar si este grupo puede ser subdividido mediante los cinco espaciadores nuevos. El espaciador 1453 mostró el mayor poder discriminatorio dado que solo el 40% de las cepas fueron positivas, mientras los demás estaban presentes entre el 80% y 90% de las cepas estudiadas. Este resultado sugiere que algunos de los nuevos espaciadores podrían ser mejores candidatos para la tipificación de *M. bovis* que aquellos incluidos actualmente en la membrana de spoligotyping.

Conforme con el objetivo mencionado anteriormente en relación al mejoramiento del spoligotyping como método de tipificación, los espaciadores encontrados en este trabajo fueron incluidos en nuevas membranas en conjunto con otros nuevos espaciadores provenientes de distintas cepas del Complejo, como por ejemplo *M. canetti*. A su vez los espaciadores actuales fueron rediseñados de acuerdo a su secuencia a fin de obtener un mejoramiento en la señal de hibridación positiva. En conjunto las nuevas membranas contienen un total de 104 espaciadores: 51 espaciadores nuevos entre los que se incluyen los identificados en este trabajo y los 43 actuales rediseñados.

La evaluación de esta nueva generación de spoligotyping se realizó en colaboración con el Dr. Van der Zanden de Holanda utilizando una colección de aislamientos pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* de dicho laboratorio holandés. A estos aislamientos se les sumó un grupo de cepas de *M. bovis* provenientes de bovinos de Argentina.

Gracias a esta membrana de nueva generación el poder discriminatorio de la técnica se ha mejorado desde un número de 160 spoligotipos entre 314 aislamientos, a un total de 174 spoligotipos distintos, si bien este resultado implica una leve mejora con respecto al uso de la membrana tradicional, el spoligotyping tiene una ventaja significativa cuando es utilizado en aislamientos que presentan 5 o menos copias de IS*6110*, siendo este el caso de las cepas de *M.bovis*, donde en este estudio pudo observarse un aumento de 17 a 26 patrones distintos mediante la aplicación de la nueva membrana respecto de la membrana tradicional.

Por otra parte la aplicación del spoligotyping de nueva generación permitió obtener más información acerca de otras especies y subespecies dentro del Complejo *M. tuberculosis* como por ejemplo *M. microti* donde mediante el uso de la membrana tradicional esta especie reacciona en general solo con dos espaciadores, en cambio con la nueva membrana se observó hibridación positiva en siete espaciadores adicionales. Lo mismo se observó para *M. canetti* que también reacciona sólo con dos espaciadores del spoligotyping tradicional, en cambio con el uso de la nueva membrana se obtiene reacción en 26 espaciadores. Asimismo en el caso de *M. bovis* subsp. *caprae* se obtuvieron dos patrones adicionales al utilizar las nuevas membranas con respecto del spoligotyping tradicional. Estos resultados posibilitan incrementar el poder discriminatorio en aislamientos pertenecientes a estas especies, lo que hasta el momento la membrana tradicional de spoligotyping no permitía.

Finalmente se pudo demostrar que el número mínimo de espaciadores necesarios para obtener el mismo poder discriminatorio en todos los aislamientos analizados que el total de los 104 utilizados, es de 40. Esto posibilita trabajar con un número menor de espaciadores, siendo que los 104 utilizados aquí se hallan ubicados en un total de tres membranas, lo que hace dificultoso su manejo, en cambio con el uso de sólo los 40 mencionados se podría utilizar una sola membrana manteniendo el mismo grado de diferenciación.

El spoligotyping es una herramienta de suma utilidad en la identificación de las distintas especies y subespecies dentro del Complejo *M. tuberculosis* además de proveer información adicional de las características de dichas subespecies. En nuestro laboratorio la aplicación del spoligotyping a diferentes aislamientos de *M. bovis* ha permitido obtener una detallada información epidemiológica a través de la cual se pudo establecer que en nuestro país existe un genotipo mayoritario, mientras que otros pueden ser asignados a regiones geográficas determinadas (Zumárraga *et al*, 1999b). A su vez a medida que se establezcan zonas libres de tuberculosis, en el caso de producirse un eventual rebrote, conociendo la cepa que lo originó y el movimiento de los animales, es posible identificar el lugar de inicio del brote (ruta epidemiológica), lo que es de suma importancia en la aplicación de los programas de control, en especial en etapas avanzadas de erradicación de esta enfermedad.

Como un segundo objetivo que apunta al conocimiento de la Región DR, se realizó un estudio comparativo entre distintas especies no pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*. Como consecuencia de este trabajo pudo identificarse que un segmento genómico que contiene alrededor de 21 genes, y que abarca desde el gen Rv2801 al Rv2824 incluyendo a la Región DR presente en el Complejo *M. tuberculosis*, está ausente en los genomas de *M. avium, M. smegmatis*, *M. marinum* y *M. lepra*. Esto es así a pesar de la elevada similitud de secuencias que se encontró en los distintos genomas micobacterianos en estudio hasta el momento. Este segmento probablemente haya sido adquirido por un ancestro común a *M. tuberculosis*. Esta conclusión se basa en la hipótesis de que *M. avium* y *M. smegmatis* posiblemente sean especies más antiguas que *M. tuberculosis* (Sreevatsan *et al*, 1997), y por ende es más probable que *M. tuberculosis* haya ganado esta región a través del proceso evolutivo, que la ocurrencia de dos eventos independientes hiciera posible que tanto *M. avium* y *M. smegmatis* perdieran esta región. La hipótesis de que *M. avium* y *M. smegmatis* aparecieron primeramente en la evolución se basa en: a) La observación de que

sus genomas son de mayor tamaño que el de *M. tuberculosis* (www.tigr.org/tdb/mdbinprogress.html), a su vez deleciones progresivas parecen haber sido la fuerza evolutiva predominante que llevó a la especiación en el Complejo *M. tuberculosis* (Brosch *et al*, 2002), como así también en *M leprae* (Eiglmeier *et al*, 2001), y b) Sreevatsan y col. observaron que los niveles de polimorfismo alélico registrados en los genes de *M. avium* son mucho mayores que en *M. tuberculosis* lo que nuevamente sugiere una especiación más temprana (Sreevatsan *et al* 1997).

La función de la mayoría de las proteínas codificadas en el segmento Rv2801 a Rv2824 es desconocida, pero muchas de las proteínas codificadas por marcos abiertos de lectura río arriba de la Región DR (Rv2801, Rv2807, Rv2810, Rv2812) son similares a proteínas de unión al ADN o a transposasas putativas. Los genes Rv2805 y Rv2807 parecen ser genes duplicados. Río abajo de la Región DR no se hallaron homologías significativas. La expresión del Rv2813 ha sido previamente demostrada mediante RT-PCR por Rindi y col. (Rindi *et al*, 1999). El contenido G+C de esta región es ligeramente menor con respecto al resto del genoma (63.46% vs 65.6 %), lo que no parecería indicar que esta región proviene de otros géneros filogenéticamente más alejados. Por otra parte parecería que muchos de estos genes no son requeridos en la virulencia, dado que están ausentes en distintos aislamientos asociados con brotes de *M. tuberculosis*: los genes Rv2816 a Rv2819 no se encuentran el genoma de la denominada cepa Beijing 120, tanto como en una cepa asociada a la anterior que provocó un importante brote nosocomial de tuberculosis en Argentina (Ritacco *et al*, 1997; Alito *et al*, 1999). Estos mismos marcos abiertos de lectura se encuentran ausentes en algunas cepas de *M. microti* en una deleción denominada MiD1 (Brodin *et al*, 2002). Por otra parte los genes Rv2800 y Rv2825 de *M. tuberculosis* como así también sus ortólogos en *M. bovis* BCG, *M. avium* y *M. smegmatis* parecen ser esenciales dado que se encuentran presentes en todas las especies mencionadas.

El mecanismo molecular que llevó a la inserción de este fragmento en el genoma de *M. tuberculosis* es aún desconocido, pero se podría especular que la presencia de transposasas putativas presentes río arriba de la Región DR puedan haber jugado un rol esencial en la inserción de la región en el genoma de *M. tuberculosis*. Por otra parte el gen Rv2813 es significativamente similar a un gen codificado en un plásmido presente en *M. celatum*, el cual se encuentra cercano a una doble repetición directa en tandem de 18pb. que no presenta ninguna función conocida, (Picardeau y Vincent, 1998; Picardeau *et al*, 2000; Le Dantec *et al*, 2001). Esta estructura es sumamente similar a la organización de la región DR de *M. tuberculosis* (2 x 18pb = 36pb.), sugiriendo la posibilidad que la región DR podría haber sido adquirida por *M. tuberculosis* a partir de un plásmido micobacteriano, no necesariamente el plásmido de *M. celatum*. Si bien muchos autores han propuesto transferencia horizontal de material genético en micobacterias, (Howard *et al*, 2002; Le Dantec *et al*, 2001; Parsons *et al*, 1998), este sigue siendo un tema controvertido al cual este trabajo de tesis aporta evidencia a favor del mismo.

En suma los resultados observados sugieren la posibilidad de que la Región DR haya sido ganada por *M. tuberculosis* o por un ancestro a través del proceso evolutivo. En este momento genomas de otras micobacterias están siendo secuenciados lo que permitirá por extensión de este análisis corroborar o refutar esta observación.

La comparación de genomas a través del uso de microarreglos de ADN en micobacterias permitió identificar regiones de diferencia (RDs) entre los distintos genomas estudiados, en particular en el genoma de *M. bovis* BCG. Esta tecnología ha confirmado los resultados obtenidos por Mahairas y col. acerca de la causa de la avirulencia de esta cepa (Mahairas *et al*, 1999), y a su vez permitió identificar nuevas regiones previamente no descriptas ausentes en su cromosoma (Behr *et al*, 1999). La secuenciación de los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* posibilitó la construcción de los mencionados microarreglos

genómicos y por otra parte también permitió realizar comparaciones *in silico* de ambos genomas completos, como método de búsqueda de diferencias entre ambos patógenos. Así estos son métodos sumamente útiles para analizar rápidamente genomas completos en la búsqueda de nuevos rearreglos genómicos, como las deleciones.

La decisión de utilizar *M. microti y M. pinnipedii* en los ensayos con microarreglos se basó en la búsqueda de factores que estuvieran ausentes en estas especies y presentes en *M. tuberculosis* o *M. bovis* y que explicaran las diferencias fenotípicas observadas entre estas especies, en particular respecto de los factores previamente mencionados como rango de hospedador, virulencia, etc.

El análisis realizado en las distintas cepas de *M. microti* mediante la implementación de microarreglos llevó a la identificación de una nueva deleción denominada MiD4 que se encuentra deletada en todas las cepas de *M. microti* estudiadas, lo que sugiere que la misma puede haber ocurrido en un ancestro común al linaje de *M. microti.* Por otro lado MiD4 también está ausente en *M. pinnipedii* y dado que esta nueva especie del Complejo *M. tuberculosis* está evolutivamente cercana a *M. microti* también es posible que la deleción haya ocurrido en un ancestro común a ambas bacterias (Brosch *et al*, 2002; Cousins *et al*, 2003). Sin embargo esta conclusión debe tratarse con sumo cuidado dado que el uso de deleciones como marcadores evolutivos demandan que no se hayan generado en locus hipervariables, puesto que si este fuera el caso la deleción podría haber surgido independientemente en múltiples linajes. La naturaleza altamente repetitiva del ADN que se encuentra flanqueando la deleción sugiere la posibilidad de que este locus sea blanco de deleciones, lo que ofrece una explicación alternativa a la aparición de la deleción tanto en *M. microti* como en *M. pinnipedii.* Por estos motivos es necesario ampliar el análisis a un mayor número de asilamientos de ambas especies para confirmar esta hipótesis.

La familia ESAT-6 es un grupo de proteínas relacionadas entre sí, codificados por 23 genes que generalmente se encuentran de ubicados en tamden de a dos a lo largo del

genoma de *M. tuberculosis*, (Cole *et al*, 1998). El total de las deleciones de *M. microti* removieron 6 de esos genes, *esx*A/*esx*B (RD1mic) *esx*V/*esx*W (RD8) y *esx*R/*esx*S (MiD4). Esto tiene un paralelo con lo que ocurre en *M. bovis* donde, junto con la pérdida del par *esx*V/*esx*W en RD8, *esx*O/*esx*P en RD5, *esx*C y *esx*F también están deletadas o interrumpidas (Garnier *et al*, 2003).

Muchas de las proteínas de esta familia han mostrado ser potentes antígenos con epítopes T, siendo el caso más estudiado el de las proteínas ESAT-6 y CPF10 codificados en la región RD1. Asimismo otro de los genes presentes en MiD4, Rv 3019c (*esx*R), ha sido identificado como altamente reconocido por linfocitos T en individuos vacunados con BCG, en enfermos de TBC (Skjot *et al*, 2002), y en ganado infectado por *M. bovis* (Vordermeier *et al*, 2003). Por otra parte la duplicación de los miembros de la familia ESAT-6 ha sido propuesta como fuente de variación antigénica (Skjot *et al*, 2002), por ende la deleción de genes *esx* puede llevar a un decrecimiento de dicha variación aunque aún no está claro si esto puede conferir una ventaja adaptativa o no. Pym y col. han demostrado que la complementación de la región RD1mic, que contiene a los genes *esx*A/*esx*B, lleva a un aumento de la virulencia en *M. microti* (Pym *et al*, 2002), por ello es posible que la pérdida de los genes *esx*V/*esx*W y *esx*R/*esx*S puedan explicar la atenuación observada en esta especie.

La familia de genes que codifica para las proteínas PE y PPE también aparecen frecuentemente en las deleciones presentes en todo el Complejo *M. tuberculosis*, en particular las deleciones de *M. microti*, RD1mic, RD8, MiD3 y MiD4 removieron 4 proteínas PE y 5 PPE.; estos genes presentan un alto grado de variación en todos los miembros del Complejo e incluso entre cepas de la misma especie. Cole y col. fueron los primeros en especular que las proteínas PE/PPE podrían ser de importancia inmunológica como fuente de variación antigénica (Cole *et al*, 1998). En otros trabajos se ha observado que algunas proteínas PE-PGRS están asociadas a superficie de membrana y son

inmunogénicas (Banu *et al*, 2002; Brennan *et al*, 2001). La utilización de la STM (*Signature tagged mutagenesis*) por el grupo de Camacho y col. mostró que la inactivación la PPE46, Rv3018c, lleva a la atenuación de *M. tuberculosis* en el modelo murino (Camacho *et al*, 1999), esta observación es interesante dado que la inactivación de un gen tan próximo a la deleción MiD4 atenúa *M. tuberculosis* lo que aporta aún más evidencia de que la pérdida de MiD4 podría llevar a la atenuación observada en *M. microti*. A su vez ortólogos a la familia PE/PPE han sido identificados como posibles factores de virulencia en *M. marinum* y en *M. avium* (Hou *et al*, 2002; Ramakrishnan *et al*, 2000).

En este trabajo de tesis también se estudio el genoma de *M. pinnipedii* empleando microarreglos genómicos. La elección de esta especie en particular se debió a que, conjuntamente con otros autores, nuestro laboratorio ha venido trabajando con aislamientos provenientes de mamíferos marinos, con el objeto de realizar una caracterización detallada de los mismos. Algunos de los primeros trabajos realizados (Romano *et al*, 1995; Alito *et al*, 1999; Zumárraga *et al*, 1999a) permitieron establecer que estos aislamientos comparten características genéticas con *M. bovis* y características antigénicas y genéticas con *M. tuberculosis*. Asimismo distintos estudios epidemiológicos han revelado que estos aislamientos forman un grupo definido y diferente dentro del Complejo *M. tuberculosis* (Zumárraga *et al*, 1999b). Por otra parte Brosch y col. mediante estudios de genómica comparativa han demostrado que los aislamientos que este grupo ha denominado "seal bacillus" por "bacilo proveniente de lobos marinos", se encuentran evolutivamente separados de *M. bovis* por al menos tres deleciones (Brosch *et al*, 2002). Recientemente y luego de las diversas observaciones que así lo fundamentan, estos aislamientos han sido propuestos conjuntamente por nuestro laboratorio y distintos grupos de investigación, como una nueva especie dentro del Complejo *M. tuberculosis* denominada *M. pinnipedii* (Cousins *et al*, 2003). Por otra parte otros métodos de tipificación empleados recientemente (Ahmed *et al*, 2003), aportan mayor evidencia respecto a que *M. pinnipedii* sería una nueva especie

dentro del Complejo. En el mencionado trabajo se utilizaron 19 marcadores de los denominados FAFLP, que aparecen como polimórficos entre *M. pinnipedii* y tanto *M. bovis* como *M. tuberculosis*. Más aún, uno de estos *loci* fue propuesto como un marcador específico de *M. pinnipedii*. Los autores encuentran un marcador FAFLP asociado al gen Rv3888c, presente en *M. pinnipedii* pero ausente en *M. bovis*. Estas observaciones coinciden con los resultados presentados aquí. A pesar de esto, los genes Rv3343c, Rv0755c, Rv0468, Rv3614c, Rv1798, Rv1507c y Rv3390 que corresponden a marcadores FAFLP presentes en *M. bovis* y ausentes en *M. pinnipedii* según estos autores, fueron identificados en todos los aislamientos de *M. pinnipedii* según los resultados de las hibridaciones realizadas en el presente trabajo. A su vez estos autores encuentran que un marcador asociado al gen Rv1507c y presente en *M. bovis*, estaría ausente en *M. pinnipedii*, al contrario de lo observado en esta tesis. Este marcador esta comprendido en la deleción RD4 definida por Brosch y col. como ausente en la cepa de referencia *M. bovis* AF2122/97. Las razones de estas discrepancias podrían deberse al hecho de que el tipo de microarreglo genómico utilizado aquí no permiten identificar mutaciones puntuales ni tampoco deleciones parciales.

Los microarreglos genómicos utilizados en las hibridaciones con *M. pinnipedii*, contenían fijados todos los genes de las dos cepas de *M. tuberculosis* secuenciadas (H37Rv y CDC1551) y a su vez incluían genes adicionales específicos de la cepa de referencia secuenciada AF2122/97 de *M. bovis* ausentes en ambas cepas de *M. tuberculosis;* de esta manera se incrementa el poder discriminatorio del microarreglo.

En consecuencia con la aplicación de la mencionada tecnología se pudieron identificar dos regiones ausentes exclusivamente en *M. pinnipedii*. En primer lugar la deleción denominada PiD1 que fue identificada por primera vez en este estudio, como ausente en todos los aislamientos de *M. pinnipedii* analizados. La estructura de los MLAs en la zona adyacente a la deleción se haya interrumpida, lo que indicaría efectivamente que se trata de una deleción y no de otro tipo de rearreglo genómico, a su vez no se encontraron en

la zona flanqueante ningún tipo de secuencia repetitivas, lo que sugiere que la deleción ocurrió como un único evento irreversible en un ancestro común. PiD1 removió del genoma los genes homólogos a Rv3531c parte del Rv3530c de *M. tuberculosis* H37Rv, los cuales codifican una proteína hipotética y una posible óxidoreductasa involucrada en el metabolismo celular, respectivamente. La implicancia de la pérdida de estos genes en cuanto al rango de hospedador y demás características fenotípicas en *M. pinnipedii*, aún no ha podido ser establecida. En segundo lugar se identificó otra deleción denominada PiD2, específica de *M. pinnipedii* que fue descripta paralelamente a este trabajo por Marmiesse y col. como RD2*seal*, debido a que se superpone con la denominada RD2 y abarca los genes Rv1978 y Rv1979 (Marmiesse *et al*, 2004; Brosch e*t al*, 2002). A su vez esta región está ausente en algunos aislamientos de *M. microti*; a pesar de ello, se denominó a esta región RD2mic dado que se localiza en una zona diferente de la mencionada RD2*seal* o PiD2. Conjuntamente estos resultados y el hecho que RD2, región que está ausente en algunas *M. bovis* BCG pero no en todas las cepas estudiadas, posea un tamaño mayor (10.7kb.) que el de RD2mic, refuerzan la suposición de que estos eventos sucedieron independientemente a lo largo del proceso evolutivo en estas micobacterias y que esta región sería una zona inestable y plástica en el genoma.

En suma a través del uso de microarreglos genómicos fue posible identificar una nueva deleción presente tanto en *M. microti* como en *M. pinnipedii* que afecta genes pertenecientes a la familia de proteínas ESAT-6 y PE/PPE que podrían dar cuenta de la atenuación observada especialmente en *M. microti*. Por otra parte y de mayor importancia aún se pudo identificar una nueva deleción específica de *M. pinnipedii*, la que podría ser utilizada como un nuevo marcador filogenético en estudios evolutivos y como blanco para la rápida identificación y diagnóstico. Por ende estos resultados conjuntamente con los de los demás autores, refuerzan el hecho de elevar a los aislamientos de mamíferos marinos a la categoría de nueva especie dentro del Complejo *M. tuberculosis*.

Como último punto de este trabajo de tesis se realizó una comparación *in silico* del genoma completo de *M. bovis* AF2122/97 con respecto al genoma de *M tuberculosis* H37Rv. Si bien esto fue realizado previamente por el grupo que secuenció el genoma de *M. bovis* (Garnier *et al*, 2003), el objetivo de este punto fue identificar mediante esta comparación, zonas genómicas que permitan distinguir entre una y otra micobacteria que no hayan sido previamente descriptas, y que a su vez no incluyeran secuencias de inserción y polimorfismos de un único nucleótido.

La comparación completa de ambos genomas permitió confirmar las diferencias previamente identificadas (Brosch *et al*, 2002, Garnier *et al*, 2003, Marmiesse *et al*, 2004, García-Pelayo *et al*, 2004) como las ya mencionadas regiones de diferencia (RDs), los *loci* de inserción de la secuencia IS*6110* y distintas mutaciones puntuales. Conforme al objetivo de esta parte del trabajo fueron excluidas del análisis posterior.

De acuerdo a la selección realizada se pudieron identificar en particular cuatro genes con características distintivas entre ambas especies: el operón *lpp*A-B, y los genes Rv0648, Rv3479 y *rpf*A

Uno de los marcadores identificados fue el operón *lpp*A-B, este marcador codifica para lipoproteínas de membrana y presenta tanto en algunos aislamientos de *M. tuberculosis* como en todos los de *M. bovis* analizados, una duplicación génica del gen *lpp*A que también comparte con la cepa de referencia *M. tuberculosis* CDC1551, pero que se haya ausente en la cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG. Los aislamientos de *M. pinnipedii* y *M. microti* analizados parecen carecer de esta duplicación.

Las otras regiones de diferencia seleccionadas luego del análisis *in silico* fueron el Rv0648 y el Rv3479, donde el primero presenta una inserción en *M. bovis* de alrededor de 500pb que constituiría una nueva región de diferencia entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*

H37Rv por lo que se trataría de una de las denominadas RvD, es decir una región ausente en *M. tuberculosis* H37Rv. Aquí se propone denominar a esta nueva región RvD6 para continuar con la actual nomenclatura propuesta por Gordon y col. (Gordon *et al*, 1999b). El segundo de estos dos genes, Rv3479, presenta una deleción interna en *M. bovis*. La deleción provoca además de un gen más corto, un cambio de fase en el extremo 3′ codificando para una secuencia aminoacídica distintas en los últimos 15 codones. Luego del codon stop de esta proteína truncada y quimérica se encuentra en *M. bovis* otro gen que codifica para una proteína idéntica a la porción C-terminal de Rv3479. Este gen se encuentra intacto en *M. tuberculosis* H37Rv.

El último de los genes seleccionados, que codifica para un factor promotor de la resucitación en *M. tuberculosis* luego de que la bacteria entra en latencia (Mukamolova *et al*, 1998), presenta una deleción en marco de lectura en *M. bovis* respecto de *M. tuberculosis*, lo que lleva a la síntesis de una proteína más corta.

Los resultados obtenidos *in silico* para los cuatro marcadores fueron confirmados *in vitro* mediante amplificación por PCR en distintos aislamientos pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*. Dichas amplificaciones permitieron determinar el potencial uso de estos marcadores como elementos que lleven a diferenciar entre distintas especies del Complejo. Si bien es necesario extender este análisis a un mayor número de aislamientos, en particular se propone el uso de Rv3479 para identificar a *M. bovis* respecto de los demás miembros del Complejo, inclusive de *M. bovis* BCG, dado que el producto de amplificación obtenido en este caso es menor que para los demás miembros analizados (*M. tuberculosis, M. pinnipedii, M. bovis* subsp. *caprae* y *M. microti*).

Mediante las amplificaciones de *rpf*A, se observó que existe un polimorfismo en este gen en particular entre distintos aislamientos de *M. bovis*, lo que haría a este marcador un blanco interesante para la tipificación molecular de aislamientos. Debido a este último resultado se decidió secuenciar el producto de amplificación obtenido en los aislamientos

que presentaban el mencionado polimorfismo y comparar la secuencia con las de las distintas cepas completamente secuenciadas. El análisis detallado de dicha secuencia permitió determinar que la zona central de esta proteína presenta repeticiones conservadas perfectas de 8 aminoácidos y otras repeticiones degeneradas. La secuencia de esta proteína en *M. bovis* AF2122/97 mostró que esta cepa carece de algunas de estas repeticiones, motivo por el cual la proteína presenta la mencionada disminución en su peso molecular. Esto es lo mismo que ocurre en los aislamientos locales secuenciados, es decir el polimorfismo observado se debe a una pérdida secuencial de estas repeticiones en la proteína, lo que se observa en la amplificación de dicho gen como un producto de menor tamaño. Las implicancias de estas sucesivas pérdidas genómicas entre los distintos aislamientos aún no han sido dilucidadas debido a que no se pudo determinar aún si esto afectaría la expresión y función de la proteína, pero nuevamente demuestran que las deleciones en las micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*, sin duda han sido la razón principal en la evolución y moldeado de los correspondientes genomas.

Los resultados obtenidos hacen del análisis bioinfomático de genomas una herramienta válida para la búsqueda de factores diferenciales entre especies, en particular dentro del Complejo *M. tuberculosis*, donde, si bien hoy en día se cuenta con distintas técnicas para tipificación y diagnóstico, es importante obtener nuevas herramientas que permitan un diagnóstico rápido y confiable.

La investigación en micobacterias ha cambiado considerablemente en los últimos años debido a la información obtenida a partir de la secuenciación en primer lugar de *M. tuberculosis* y en segundo lugar de *M. bovis*. A pesar de esto la variabilidad genómica entre distintos aislamientos tanto de estas dos especies, como de los demás miembros del Complejo, no ha sido profundamente estudiada. En este sentido el trabajo de Behr y col. ha sentado las bases de la comparación genómica entre distintos aislamientos de *M. bovis* BCG

utilizando microarreglos genómicos (Behr *et al*, 1999). Asimismo recientemente Marmiesse y col, han establecido un nuevo cuadro evolutivo del Complejo *M. tuberculosis* a través del uso combinado de la bioinformática y las hibridaciones genómicas a macroarreglos de ADN entre distintos aislamientos pertenecientes a diferentes especies del Complejo (Marmiesse *et al*, 2004).

Debido a la necesidad de obtener la mencionada información respecto de la variabilidad genética, se planteó en este trabajo la utilización de la genómica comparativa entre aislamientos pertenecientes a nuestro país de distintas especies del Complejo *M. tuberculosis*. Este enfoque no sólo tuvo como objetivo profundizar en el conocimiento de los genomas micobacterianos, sino además la identificación de regiones, que permitan contar con nuevas herramientas en la tipificación y en especial en la diferenciación de dichos aislamientos.

Conforme a estos objetivos, en este trabajo se identificaron regiones genómicas especificas de cada una de las especies analizadas, que posibilitaron en primer lugar el mejoramiento del spoligotyping, principal técnica de tipificación utilizada en *M. bovis* (Caimi *et al*, 2001; van der Zanden *et al*, 2002). En segundo lugar, se pudo establecer el origen evolutivo de la Región DR en la que se basa dicha técnica, proponiéndose que esta región fue ganada por las micobacterias del Complejo *M. tuberculosis* través del proceso evolutivo (Caimi y Cataldi, 2004). Esto concuerda con lo mencionado anteriormente respecto a que las deleciones progresivas parecen ser la fuerza preponderante que moldeó los genomas de estas micobacterias (Brosch *et al*, 2002), por lo cual es más factible que esta región haya sido ganada que se haya perdido exactamente el mismo fragmento en otras especies de micobacterias en eventos independientes a través de la evolución.

Por último las regiones genómicas identificadas mediante la utilización de microarreglos genómicos y bioinfomática, permitirían primeramente explicar las diferencias fenotípicas observadas en distintos miembros del Complejo en particular respecto de la

virulencia, al mismo tiempo que podrían ser utilizadas en la diferenciación y tipificación entre especies (García-Pelayo *et al*, 2004, Bigi *et al*, manuscrito en preparación).

Por lo expuesto y debido a la necesidad de implementar racionalmente en nuestro país programas de control, especialmente en micobacterias responsables de enfermedades zoonóticas como *M. bovis*, es de fundamental importancia el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico, diferenciación y tipificación a su vez contar con nuevas terapéuticas y estrategias preventivas en la lucha contra la tuberculosis.

9. CONCLUSIONES

- Mediante la secuenciación de la Región DR en aislamientos bovinos argentinos pertenecientes a *M. bovis*, se pudieron identificar cinco nuevos espaciadores, que en conjunto con otros descriptos previamente, permitieron incrementar el poder discriminatorio del spoligotyping.

- La Región DR provendría de un ancestro común a las especies pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* como resultado de un evento único de inserción.

- *M. microti* presenta una nueva deleción genómica de 2.4kb., denominada MiD4 que abarca genes que codifican para la familia de proteínas ESAT-6 y PE-PPE. Esta deleción posiblemente se encuentre involucrada en la menor virulencia observada en esta especie respecto de otros miembros del Complejo. Esta región se haya deletada también en *M. pinnipedii.*

- *M. pinnipedii* posee dos deleciones genómicas, PiD1 y PiD2. PiD1 involucra a una proteína óxidoreductasa y a una proteína de membrana y PiD2 a una proteína conservada y a una permeasa, respectivamente. PiD2 esta presente también en *M. microti* con una ligera diferencia de localización por lo que se la denominó RD2mic debido a que abarca una parte de la deleción RD2 de *M. bovis* BCG. PiD1 es específica para *M. pinnipedii*, lo que permitiría utilizar esta deleción como un marcador en la diferenciación y especiación de esta especie.

- El genoma de *M. bovis* presenta diferencias respecto de *M. tuberculosis* H37Rv, que pueden ser utilizadas en la diferenciación de esta especie respecto de otros miembros del Complejo *M. tuberculosis*. En particular se identificó una nueva región de diferencia ausente en *M. tuberculosis* H37Rv que se denominó RvD6.

- La genómica comparativa demostró ser una herramienta útil en la identificación de regiones específicas y diferenciales entre especies responsables de enfermedades zoonóticas, pertenecientes la Complejo *M. tuberculosis*.

K CAIMI

A. CATALDI

10. BIBLIOGRAFIA

Ahmed, N., Alam, M., Abdul Majeed, A., Asad Rahman, S., Cataldi, A., Cousins, D. and Hasnain, S.E. 2003. Genome sequence based, comparative analysis of the fluorescent amplified fragment length polymorphisms (FAFLP) of tubercle bacilli from seals provides molecular evidence for a new species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Infect Genet Evol. Feb; 2(3):193-9.

Alito, A., Romano, MI., Bigi, F., Zumárraga, M., Cataldi, A. 1999. Antigenic characterization of mycobacteria from South American wild seals. Vet Microbiol 68: 293-299.

Alito, A., Morcillo, N., Scipioni, S. 1999. IS6110 restriction fragment length polymorphism in particular multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliably use in outbreak investigation. JCM 37:788-791.

Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Domínguez, L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. Nov;53 (6):1785-9.

Aranaz, A., Liébana, E., Gomez-Mampaso, E., Galan, JC., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G., Domínguez, L. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Bacteriol. Jul;49 Pt 3:1263-73.

Armstrong, J.A. y Hart, P.D. 1971. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. J. Exp. Med 134:713-740.

Armstrong, J.A. y Hart, P.D. 1975. Phagosome-lysosome interaction in cultured macrophages infected with tubercle bacilli. J.Exp. Med. 142:1-16.

Arruda, S., Bomfim, G., Knights, R., Huima-Byron, T. and Riley. 1993. Cloning of *M.tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. Science 261:1454-1457.

Ausubel, F. M, R. Brent, R E Kingston, D Moore, J G Seidman, J A Smith and K Struhl. 1995. Current Protocols in molecular Biology. Massachusetts. General Hospital. Harvard Medical School. Edited by John Wiley & Sons, Inc.

Banu, S., Honoré, N., Saint-Joains, B., Philpott, D., Prévost, M and Cole, S.T. 2002. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens. Mol Microbiol 44:9-19.

Beggs, M., Cave, M., Marlowe, C., Cloney, L., Duck, P. and Eisenbach, K. 1996. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex direct repeat sequence for use in cycling probe reaction. JCM 34: 2985-2989.

Behr, M. A., M. A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G. K. Schoolnik, S. Rane and P. M. Small.1999. Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray Science. 284: 1520-1523.

Bernard, D., Dulbeco, R., Eisen, H., Ginsberg, H., Wood, W. 1973. Microbiology.2nd Edtion.

Bernardelli, A., Bastida, R., Loureiro, J., Michelis, H., Romano, MI., Cataldi, A., Costa, E. 1996. Tuberculosis in sea lions and fur seals from the south-western Atlantic coast. Rev Sci Tech. Sep;15(3):985-1005.

Berthet, F., Rasmussen, P., Rosenkrandt, I., Andersen, P. and Gicquel, B. 1998. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). Microbiology 144:3195-3203.

Bifani, PJ. Mathema, B., Liu, Z., Moghazeh, SL., Shopsin, B., Tempalski, B., Driscol, J., Frothingham, R., Musser, JM., Alcabes, P., Kreiswirth, BN. 1999. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. JAMA. Dec 22-29;282(24):2321-7.

Bigi, Fabiana, M. Carmen Garcia-Pelayo, Javier Nuñez-García, Andrea Peralta, Karina C. Caimi, Angel Cataldi, Stephen V. Gordon and Maria I. Romano. 2004. Comparative genomic revealed a novel deletion on *M. pinnipedii* genome. Manuscrito en preparación.

Bigi, F., Alito, A., Romano, M.I., Zumárraga, M., Caimi, K. and Cataldi, A. 2000. The gene encoding P27 lipoprotein and a putative antibiotic-resistance gene form an operon in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis.* Microbiology 146, 1011–1018

Blázquez, J., Espinosa de Los Monteros, LE., Samper, S., Martin, C., Guerrero, A., Cobo, J., Van Embden, J., Baquero, F., Gomez-Mampaso, E. 1997 Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. J Clin Microbiol. Jun;35(6):1390-3.

Boisvert, H. 1966 Identification of *Mycobacterium bovis*, BCG and *Mycobacterium microti.* Ann Inst Pasteur (Paris) Aug;111(2):180-92

Bouvet, E., Casalino, E., Mendoza-Sassi, G., Lariven, S., Vallee, E., Pernet, M., Gottot, S., Vachon, F. 1993.A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. A case-control study. AIDS. Nov;7(11):1453-60.

Braibant, M., Gilot, P. and Content, J. 2000. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis.* FEMS Microbiol. Lett. 24: 449-467.

Brennan, M. J., Delogu, G., Chen, Y., Bardarov, S., Kriakov, J., Alavi, M. and Jacobs, W. R., Jr. 2001. Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. Infect Immun 69, 7326-7333.

Brodin, Priscille, Karin Eiglmeier, Magali Marmiesse, Alain Billault, Thierry Garnier, Stefan Niemann, Stewart T. Cole, and Roland Brosch 2002. Bacterial Artificial Chromosome-Based Comparative Genomic Analysis Identifies *Mycobacterium microti* as a Natural ESAT-6 Deletion Mutant. I & I. Oct. Vol 70, No. 10, 5568–5578

Brosch, R., Gordon, SV., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutiérrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, LM., Pym, AS., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, ST. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS 99(6):3684-3689.

Brosch, R., Phillipp, W., Stavropolous, E., Colston, M., Cole, S.T. and Gordon, S. 1999. Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* h37Rv and the attenuated *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Infec immune 67:5768-5774.

Brosch, R., Gordon, S., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Soravito, C., Barrell, B. and Cole, S.T. 1998. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing and comparative genomics. Infec. Immun. 66: 2221-2229.

Bunschoten, A., Molhuizen, H., Schouls, L., van Soolingen, D., van Embden, J. 1995 Spoligotyping a method to detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands.

Caimi, K., Romano, M.I., Alito, A., Zumárraga, M., Bigi, F and Cataldi, A. 2001. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. JCM. Mar. Vol 39. 3: 1067-1072.

Caimi, Karina and Cataldi, Angel. 2004. A fragment of 21 ORFs around the direct repeat (DR) region of *Mycobacterium tuberculosis* is absent from the other sequenced mycobacterial genomes: implications for the evolution of the DR region. Comp and Func. Genomics. Vol 5: 116-122

Calmette, A. 1927. La vaccination preventive contre la tuberculose. Paris: Masson et cie.

Camacho, L., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B. and Guillhot, C. 1999. Identification of virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. Mol. Microbiol. 34: 257-267.

Camus, Jean-Christophe, Melinda J. Pryor, Claudine Meldigue and Stewart T. Cole. 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology, 148, 2967–2973

CDC (Centre for Disease Control). 1991. Nososcomial transmission of multidrug-reistant tuberculosis among HIV-infected persons, Florida and New York, 1988-1991. MMRW 40: 585-591.

CDC (Centre for Disease Control). 1992. Transmission of multridrug-resistant tuberculosis among immunocompromised persons in a correctional system, New York 1991. MMRW 41: 507-509.

Chan, J., Fan, X., Hunter, SW., Brennan, PJ., Bloom, BR. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor envolved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. Infect. Immun 59: 1755-1761.

Clemens, D.I. y Horwitz, M.A. 1995.Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. J. Exp. Med. 181:257-270.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CEIII, Tekaia F, Badcock K, Bashman D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsboy T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S and Barrell BG (1998) "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence". Nature 393: 537-544

Cole, S.T. 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Microbiology 148: 2919-2928.

Cole, S.T. and Barrell. B. 1998. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Novartis Found Symp 217:160-172.

Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K., Thomsos, N., Wheeler, P, Honoré, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D. and other authors. 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 409:1007-1011.

Cole, Stewart T. 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology, 148, 2919–2928

Collins, D.M. de Lisle, G.W., Collins, S.D. 1994. DNA restriction fragment typing of *M. bovis* isolates from cattle and badgers in Ireland. Vet Record 134:681-682.

Collins, D.M. and De Lisle, G.W. 1985. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. JCM. 21: 562-564.

Conell, N. y Nikaido, H. 1994. Membrane permeability and transport in *Mycobacterium tuberculosis*. Chapter 22. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. B. Bloom. ASM Press Washington DC. Ed 1994. 333-352

Cosivi, O, Grange, JM, Daborn, CJ, Raviglione, MC, Fujikura, T, Cousins, D, Robinson, RA, Huchzermeyer, HF, de Kantor, I, Meslin, FX. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis. Jan-Mar;4(1):59-70.

Cousin, D.V., Williams, S.N., Reuter, R., Froshaw, D., Chadwick, B., Coughran, D., Collins, P. y Gales, N. 1993. Tuberculosis in wild seals and characterization of the wild bacillus. Aust. Vet.J. 70:92-97

Cousins, DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodriguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. Sep;53(Pt 5):1305-14.

Daffe, M., and Draper, P. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. Adv Microb. Physiol.;39:131-203.

Danborn CJ, Grange JM. 1993. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. Br Vet J. Sep-Oct;149(5):405-17.

Daniel, T.M. 2000. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? Int. J. Tuberc. Lung Dis. ; 4 (5):395-400.

Dankner, WM., Waecker, NJ., Essey, MA., Moser, K., Thompson, M., Davis, CE.1993. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. Medicine (Baltimore). Jan ;72(1):11-37

Del Portillo, P., Murillo, LA., Patarroyo, ME. 1991. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. JCM. Oct;29(10):2163-8.

Desjardins, M, Celis, JE, van Meer, G, Dieplinger, H, Jahraus, A, Griffiths, G, Huber, LA. 1994.Molecular characterization of phagosomes. J Biol Chem. Dec 23;269 (51):32194-200.

Douglas, JT, Qian, L, Montoya, JC, Musser, JM, Van Embden, JD, Van Soolingen, D, Kremer, K. 2003. Characterization of the Manila family of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. Jun;41(6):2723-6.

Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathani,V. y Raviglione, M.C. 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis estimated incidence, prevalence, and mortability country. WHO. Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 282:677-686.

Eiglmeier, K., Parkhill, J., Honoré, N., and 12 other authors. 2001. The decaying genome of *Mycobacterium leprae*. Lepr Rev 72:387-398.

Espinal MA, Dye, C., Raviglione, M., Kochi, A. 1999. Rational 'DOTS plus' for the control of MDR-TB. Int J Tuberc. Lung Dis. Jul;3(7):561-3.

Falkow, S. 1988. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenecity. Rv. Infect. Dis. 10: S274-S276.

Fang, Z., Doig, C., Kenna, D., Smittipat, N., Palittapongarnpim, P., Watt, B. and Forbers, K. 1999. IS6110-mediated deletions of wild-type chromosomes of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. 181:1014-1020.

Fang, Z., Morrison, N., Watt, B., Doig, C. and Forbes, K. 1998. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeats locus group of closely related Mycobacterium tuberculosis strains. J. Bacteriol. 180: 2102-2109.

Fine PE. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. Lancet. Nov 18;346(8986):1339-45.

Fisanotti, JC, Romano, MI, Alito, A, Bigi, F, Cataldi,A. 1997. An mpb-64 flanking sequence specific for *Mycobacterium bovis*. Res Microbiol. Jun;148(5):427-35.

Fischl, M.A., Uttamchandani, RB., Daikos, G.L., Poblete, R., Moreno, J., Reyes, R., Boota, A., Thompsom, L., Cleary, T. and Lai, S. 1992. An outbreak of tuberculosis caused by

multiple-drug resistant bacilli among patients with HIV infection. Ann Intern Med. 117: 177-183.

Frothingham, Richard and Meeker-O'Connell, Winifred A. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology, 144, 1189–1196

Garcia-Pelayo, M. Carmen, Karina C. Caimi, Jacqueline K. Inwald, Jason Hinds, Fabiana Bigi, Maria I. Romano, Dick van Soolingen, Philip D. Butcher, R. Glyn Hewinson, Angel Cataldi and Stephen V. Gordon. 2004. Microarray analysis of *Mycobacterium microti* reveals deletion of genes encoding PE-PPE proteins and ESAT-6 antigens. Tuberculosis. En prensa.

Garnier, Thierry, Karin Eiglmeier, Jean-Christophe Camus, Nadine Medina, Huma Mansoor, Melinda Pryor, Stephanie Duthoy, Sophie Grondin, Celine Lacroix, Christel Monsempe, Sylvie Simon, Barbara Harris, Rebecca Atkin, Jon Doggett, Rebecca Mayes, Lisa Keating, Paul R. Wheeler, Julian Parkhill , Bart G. Barrell , Stewart T. Cole, Stephen V. Gordon, and R. Glyn Hewinson 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. PNAS June vol. 100 no. 13: 7877–7882

Glynn, JR, Whiteley, J, Bifani, PJ, Kremer, K, van Soolingen, D. 2002. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerg Infect Dis. Aug;8(8):843-9.

Gordon, SV, Heym, B, Parkhill, J, Barrel, B, Cole, ST .1999a. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology 145(4):881-92.

Gordon, S., Eiglmeier, K., Garnier, T., Brosch, R., Parkhill, J., Barrell, B., Cole, S.T., Hewinson, G. 2001b. Genomics of *Mycobacterium bovis*. Tuberculosis (Edinb) 81: 157-163.

Gordon, S., Eiglmeier, K., Garnier, T., Parkhill, J, Barrell,B., Cole,S. and Hewinson,G 2001a. Genomics of *Mycobacterium bovis*. Tuber Lung Dis. 6:157-163.

Gordon, Stephen V., Roland Brosch, Alain Billault, Thierry Garnier,1 Karin Eiglmeier1 and Stewart T. Cole 1999b Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome Arrays. Molecular Microbiology 32 (3), 643–655

Goulding, J.N., Stanley, J., Saunders, N. and Arnold, C. 2000. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. JCM. 38:1121-1126.

Grange, J.M., Daborn, C. and Cosivi, O. 1994 HIV-related tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. Eur Respir J. Sep;7(9):1564-6.

Grimaldo ER, Tupasi TE, Rivera AB, Quelapio MI, Cardano RC, Derilo JO, Belen VA. Int J 2001. Increased resistance to ciprofloxacin and ofloxacin in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients seen at a tertiary hospital in the Philippines. Tuberc Lung Dis. Jun;5(6):546-50.

Gutiérrez, M., Samper, S., Jiménez, M. S., van Embden, J., García Marín, J. and Martín, C. 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. JCM. 35:3328-3330.

Haas, F and Haas, S. 1996. The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notion of its contagiousness. In Tuberculosis pp. 4-19. Edited by W. N. Rom and S. Garay. Boston: Little, Brown and Company.

Harris, N.B. y Barletta, R.G. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. Clinical Microbiology Rv. Jul. 14 (3):489-512

Hart, P., Sutherland, I. And Thomas, J. 1967. The immunity conferred by effective BCG and vole bacillus vaccine, in relation to the induced tuberculin sensitivity and to technical variations in the vaccines. Tubercle 48: 201-210.

Hayman, J.1984. *Mycobacterium ulcerans*: an infection from Jurasic time? Lancet 2: 1015-1016

Hensel, M., Shea, J., Gleeson, C., Jones, E. and Holden, D. 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. Science. 269: 400-403.

Hermans, P., Messadi, F., Guebrexabher, H., van Soolingen, D., de Haas, P., Heersma, H., de Neeling, H., Ayoub, A., Portaels, F., Frommel, D. 1995. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. J Inf. Dis. 171: 1504-1513.

Hermans, P., van Soolingen, D. Bik, E., de Haas, P., Dale, J. and van Embden, J. 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex. Infect. Immun. 59:2695-2705.

Hewinson, RG, Michell, S L., Russell, WP, Mcdam, RA, Jacobs, WR (Jr) 1996. Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. Scand J Immunol 43: 490-499.

Heym, B, Honore, N, Truffot-Pernot, C, Banerjee, A, Schurra, C, Jacobs, WR Jr, van Embden, JD, Grosset, JH, Cole, ST. 1994. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. Lancet. Jul 30;344(8918):293-8.

Hiriyanna, KT, Ramakrishnan, T. 1986. Deoxyribonucleic acid replication time in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Arch Microbiol. Mar;144(2):105-9.

Ho, T., Robertson, B., Taylor, G., Shaw, R and Young, D. 2001. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* genomes reveals frequent deletions in a 20kb. Variable region in clinical isolates. Yeast. 17: 272-282.

Hou, J. Y., Graham, J. E. and Clark-Curtiss, J. E. 2002. *Mycobacterium avium* genes expressed during growth in human macrophages detected by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). Infect. Immun. 70, 3714-3726.

Howard, S.T. Byrd, T. and Lyons, C. 2002. A polymorphic region in *Mycobacterium abscessus* contains a novel insertion sequence element. Microbiology 148:2987-2996.

Instituto Nacional de Epidemiología "Emilio Coni". 1998. Análisis de la morbilidad por tuberculosis en la República Argentina. Tendencia 1980-94. EP-TB 29/95, Santa Fe, 1998a.

Instituto Nacional de Epidemiología "Emilio Coni". 2001. Situación de la Tuberculosis en la República Argentina, 2001. Santa Fe..

Jacobs, WR Jr, Barletta, RG, Udani, R, Chan, J, Kalkut, G, Sosne, G, Kieser, T, Sarkis, GJ, Hatfull, GF, Bloom, BR. 1993. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. Science. May 7;260(5109):819-22.

Jacobs, W., Tuckman, M. and Bloom, B. 1987. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle plasmid. Nature (London) 327:532-535.

Jansen, R., van Embden, J., Gaastra, W. and Schouls, L. 2002. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. OMICS 6:23-33.

Kalpana, G.V., Bloom, B. and Jacobs Jr., W. 1991. Insertional mutagenesis and illigetimate recombination in mycobacteria. PNAS. 88: 5433-5437.

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agter Veld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. and Van Embden, J. 1997 Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. JCM. Apr.Vol. 35, No. 4:907–914

Kantor, IN. and Ritacco, V. 1994 Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. Vet Microbiol. May;40(1-2):5-14.

Kantor, I.N. 1988. Bacteriología de la Tuberculosis y Humana y Animal. Centro Panamericano de Zoonosis. OPS.

Kaplan, G, Gandhi, RR, Weinstein, DE, Levis, WR, Patarroyo, ME, Brennan, PJ, Cohn, ZA. 1987. *Mycobacterium leprae* antigen-induced suppression of T cell proliferation in vitro. J Immunol. May 1;138(9):3028-34.

Kapur, V., Whittam, TS, Musser JM. 1994. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15000 years old? J.Infect Dis 170: 1348-1349.

Kato-Maeda, M., Rhee, J., Gingeras, T., Salamon, H., Drenkow, J., Smittipat, N. and Small, P. 2001. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis.* Genome Res. 11: 547-554.

Kaufhold, A., A. Podbielski, G. Baumgarten, M. Blokpoel, J. Top, and L. Schouls. 1994. Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. FEMS Microbiol. Lett. 119:19–25.

Koch, R. 1882. Die Aetiologie der Tuberculosis. Ver. Klin. Wochenschr. 19:221.

Krebs, J. 1997. Bovine tuberculosis in cattle and badgers: Reports to the Rt. Hon. Dr. Jack Cunnimgham MP by the Independent Scientific review Group (Department for Environment, Food and Rural Affairs, London)

Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W., Hermans, P., Martín, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B., Riley, L., Yakrus, M., Musser, J. and van Embden, J. 1999. Comparison methods based on different molecular epidemiological markers for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex: Interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. JCM. 37:2607-2618.

Kremer, K., van Soolingen, K., van Embden, J., Hughes, S., Inwald, J. and Hewinson, G. 1998 *Mycobacterium microti*: More Widespread than Previously Thought. JCM, Sept., Vol. 36, No. 92793–2794

Latini, M.S., Latini,O.A., Lopez, M.L. y Ceconi, J.O. 1990. Tuberculosis bovina en seres humanos. Rev. Arg.Tórax 51:13-16.

Le Dantec, C., Winter, N., Gicquel, B., Vincent, V. and Picardeau, M. 2001. Genomic Sequence and Transcriptional Analysis of a 23-Kilobase Mycobacterial Linear Plasmid: Evidence for Horizontal Transfer and Identification of Plasmid Maintenance Systems. J B. Apr Vol. 183, No. 7: 2157–2164

Lehmann KB, Neumann R .1896. Atlas und Grundis der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik, 1st.ed. Munchen: JF Lehmann

Lillebaek, T, Dirksen, A, Baess, I, Strunge, B, Thomsen, VO, Andersen, AB. 2002. Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. J Infect Dis. Feb 1;185(3):401-4

Mac Leod, I.M. 1977. A case of non-pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium. africanum.* Tubercle 58(1): 39-42.

Maeda N, Nigou J, Herrmann JL, Jackson M, Amara A, Lagrange PH, Puzo G, Gicquel B, Neyrolles O. 2003. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. J Biol Chem Feb 21;278(8):5513-6.

Magdalena, J., Vacheé, A., Supply, P. and Locht, C. 1998. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. JCM. 36:937-943.

Magnus K. 1966. Epidemiological basis of tuberculosis eradication. 3. Risk of pulmonary tuberculosis after human and bovine infection. Bull World Health Organ.;35(4):483-508.

Mahairas ,G.G, Sabo, P.J., Hickey, M..J., Singh, D.C. y Stover,C.K. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis.* J. Bacteriol.. 178:1274-1282.

Mahillion, J. and Chandler, M. 1998. Insertion sequences. Microbiol. Mol Biol. Rev. 62:725-774.

Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Gutierrez, C., Simoes, N., Vincent, V., Glaser, P., Cole, S. T. and Roland Brosch. 2004. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial 'core' genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology, 150:483–496

Martin, C, Timm, J, Rauzier, J, Gomez-Lus, R, Davies, J, Gicquel, B. 1990. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. Nature. Jun 21;345(6277):739-43.

Martínez-Vivot M., Romano M.I.,Torres, P. 1997. Aplicación del Spoligotyping al análisis de la transmisión del *Mycobacterium bovis* de rodeos bovinos a caprinos. "Taller internacional sobre infecciones humanas y animales producidas por clamidias, micobacterias, brucelas y borrelias". Buenos aires 25 de junio al 4 de julio, Facultad de Ciencias Veterinarias UBA.

Mc Fadden, J.J. and Fiddler, H.M.1996. Mycobacteria as possible causes of sarcoidosis and Crohn's disease. Soc. Appl. Bacteriology Symp Ser. 25:47S-52S.

McDonough KA, Kress Y and Bloom BR 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. Infect Immun 61: 2763-2773.

Moore, VA.1913. Bovine tuberculosis and its control. Editores Carpenter y Cía, Ithaca N.Y.

Morcillo N, Alito A, Romano MI, Cataldi A, Dolmann A, Reniero A, de Kantor IN. 1996. Multidrug resistant tuberculosis outbreak in Buenos Aires. DNA fingerprinting analysis of isolates. Medicina, 56 (1):45-7.

Moreira, A.L., Wang, J., Tsenova-Berkova, L., Hellman, W., Freedman, V.H. y Kaplan, G. 1997. Sequestration of *M. tuberculosis* in tight vacuoles in vivo in lung macrophages of mice infected by the respiratory route. In. Immun. 65:305-308.

Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. 1994 The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet Microbiol. May;40(1-2):153-77.

Mukamolova, G V Kaprelyants, A S. Young, D I. Young, M. and Kell, D B. 1998. A bacterial cytokine. PNAS. USA Vol. 95: 8916–8921.

Mukamolova, G V., O A. Turapov, D I. Young, A S. Kaprelyants D B. Kell and M Young 2002. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis.* Molecular Microbiology 46 (3), 623–635.

Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollock JM, Clements A, Walton E, Bryson DG. 1994 Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. Vet Rec. Aug 6;135(6):134-5.

Neill SD, O'Brien JJ, McCracken RM. 1988. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. Vet Rec. Feb 20;122(8):184-6.

Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. 2002. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. Mar;52(Pt 2):433-6.

Niemann, S., Richter, E., Dalluegge-Tamm,H Schlesinger,H., Grampner, D., Koenigstein, B., Guruth, G., Greinert, U. and Ruesch-Gerdes, S. 2000. Two cases of *Mycobacterium microti*-derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. Emerg Infect Dis. 6:539-542.

OMS, Organización mundial de la Salud. 2004 Reporte Anual. "Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing".

OPS, Organización Panamericana de la Salud. 1994. Las condiciones de Salud en las Américas VOL 1. WHO, Global TB Control, WHO Report 1998.

Parsons, LM, Brosch R, Cole St, Somoskovi A, Loder A, Bretzel G, van Soolingen D, Hale Y, Salfinger M. 2002. Rapid and Simple Approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. JCM.. July 40 (7): 2339-2345.

Pascopella, Collins, F., Martin, J., Lee, M. H., Hatfull, G., Stover, C.K., Bloom, B. and Jacobs, W.R 1994. Use of in vivo complementation in *Mycobacterium tuberculosis* to identify a genomic fragment associated with virulence. Infect. Immun. 62: 1313-1319

Pearson, M:L., Jereb, J.A., Frieden, T.R., Crawford, J., Davis, B., Dooley, S and Jarvis, W. 1992. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a risk to patients and health-care workers. Ann Intern Med 117:191-196.

Pelicic, V., Jackson, M., Reyrat, J.M., Jacobs, W.R. Jr., Gicquel, B., Guillot, C. 1997. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. PNAS 94,10955-10960

Pelicic, V., Reyrat, M. and Gicquel, B. 1998. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. Mol. Microbiol. 28: 413-420.

Pfeifer, J.D., Wick, M.J., Roberts, R.L., Findlay, K., Norman, S.J. y Harding, C.V. 1993. Phagocityc processing of bacterial antigens for class iMHC presentation to T cell. Nature (London) 361:359-362.

Pfyffer GE, Auckenthaler R, van Embden JD, van Soolingen D. 1998 *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. Emerg Infect Dis. Oct-Dec;4(4):631-4.

Philipp, W. J., S. Nair, G. Guglielmi, M. Lagranderie, B. Gicquel, and S. T. Cole. 1996. Physical mapping of *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur reveals differences from the genome map of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and from *M. bovis*. Microbiology 142:3135-45

Picardeau, M. and Vincent, V. 1998. Mycobacterial linear plasmid have an invertron-like structure related to other linear replicons in actinomycetes. Microbiology 144: 1981-1988.

Picardeau, M., Le Dantec, C. and Vincent, V. 2000. Analysis of the internal replication region of mycobacterial linear plasmid. Microbiology 146: 305-313.

Pollock JM. and Andersen P. 1997. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle. Infect Immun 65: 2587-2592.

Poulet, S. and Cole, S.T. 1995. Characterization of the polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Microbiol 163:87-95.

Pym, A. and Brosch, R. 2000. Tools for the population genomics of the tubercle bacilli. Genome Res. 10: 1837-1839.

Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. and Cole, S. T. 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. Mol Microbiol 46, 709-717.

Ramakrishnan, L., Federspiel, N. and Falkow, S. 2000. Granuloma-specific expression of mycobacterium virulence proteins from glycine-rich PE-PGRS family. Science 288:1436-1439.

Rees A, Scoging A, Mehlert A, Young DB, Ivanyi J. 1988. Specificity of proliferative response of human CD8 clones to mycobacterial antigens. Eur J Immunol. Dec;18(12):1881-7.

Rindi, L., Lari, N. and Grazelli, C. 1999. Search for genes potentially involved in Mycobacterium tuberculosis virulence by mRNA differential display. Biochem Biophys Res Commun 258:94-101.

Ritacco V, Di Lonardo M, Reniero A, Ambroggi M, Barrera L, Dambrosi A, Lopez B, Isola N, de Kantor IN. 1997. Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. J Infect Dis. Sep;176 (3): 637-42.,

Rodriguez JG, Fissanoti JC, Del Portillo P, Patarroyo ME, Romano MI, Cataldi A. 1999 Amplification of a 500-base-pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. J Clin Microbiol. Jul;37(7):2330-2.

Romano, M.I., Alito, A., Bigi, F., Fisanotti, J.C., y Cataldi, A.1995. Genetic characterization of mycobacteria from South American wild seals. Vet.Microbiol. 47:89-98.

Romano, M.I., Alito, A., Fisanotti, J.C., Bigi, F., Kantor, I, Cicuta, M. E. and Cataldi, A. 1996.Comparison of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 47: 89-98.

Salamon, H., Kato-Maeda, M., Small, P., Drenkow, J. and Gingeras, T. 2000. Detection of deleted genomic DNA using a semiautomated computational analysis of GeneChip data. Genome Res. 10: 2044-2054.

Salo, W, Aufderheide, AC, Buikstra, J, Holcomb, TA.1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mumms. PNAS 91: 2091-2094.

Samper S, Martin C, Pinedo A, Rivero A, Blazquez J, Baquero F, van Soolingen D, van Embden J. 1997. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. AIDS. Aug;11(10):1237-42.

Sampson, S., Lukey, P., Warren, R., van Helden, P., Richardson, M. and Everet, M. 2001. Expression, characterization and subcellular localization of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE gene Rv1917c. Tuberculosis (Edinb) 81:305-317.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS 74: 5463-5467.

Santangelo, María P., Jorge Goldstein, Alicia Alito, Andrea Gioffré, Karina Caimi, Osvaldo Zabal, Martín Zumárraga, Maria I. Romano, Angel A. Cataldi and Fabiana Bigi.2002. Negative transcriptional regulation of the *mce3* operon in *Mycobacterium tuberculosis* Microbiology, 148, 2997–3006.

Schorey, J.S. Carroll, M.C. y Brown, E.J.A. 1997. Macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. Science 277:1091-1093.

Scorpio, A. and Zhang, Y. 1994. Mutations in *pnc*A, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med 2: 662-667.

Senaratne RH, Mobasheri H, Papavinasasundaram KG, Jenner P, Lea EJ, Draper P. 1998 Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.J Bacteriol. Jul;180(14):3541-7.

Silva, P., Bigi, F., Santangelo, M.P., Romano, M.I., Martín, C., Cataldi, A. and Aínsa, J. 2001. Characterization of P55, a Multidrug Efflux Pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* Antimic. Agents. and Chem. Mar. Vol. 45, No. 3:800–804

Skjot, R. L., Brock, I., Arend, S. M., Munk, M. E., Theisen, M., Ottenhoff, T. H. and Andersen, P. 2002. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the Esat-6 gene family. *Infect Immun* 70, 5446-5453.

Small, P., Shafer, R., Hopewell, PC., Singh SP, Murphy MJ, Desmond E, Sierra MF, Schoolnik GK. 1993. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. N. Engl J Med 328: 1137-1144.

Small, P.M., McClenny, N., Singh, S.P., Scoolnik, Gk., Tomkins, LS. and Mickeelsen, PA. 1994. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. JCM. 31: 1677-1682.

Smith, P. y Moss, A. 1994. Epidemiology of Tuberculosis. Chapter 4. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. B. Bloom. ASM Press Washington DC. Ed 1994. 47-60

Snapper, S., Lugosi, L., Jeckel, A., Melton, R., Kieser, T., Bloom, B and Jacobs, W. 1989. Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. PNAS 85: 6987-6991.

Sola, C., A. Devallois, L. Horgen, J. Maisetti, I. Filliol, E. Legrand, and N. Rastogi. 1999. Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. Emerg. Infect. Dis. 5:404–414.

Sorensen, A., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P. and Andersen, A. 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infec Immun 63:1710-1717.

Sreevatsan., Pan, X., Stockbauer, K., Conell, N., Kreiswirth, B., Whittam, T. and Musser, J. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination PNAS Microbiology September Vol. 94: 9869–9874,

Stead, W., Eisenach, K., Cave, M., Beggs, M., Templeton, G., Thoen, C. and Bates, J. 1995. Ann j. Resp. Crit. Care Med. 151:1267-1268.

Steenken, W. and Gardner, L.U. 1946. History of H37 strain of tubercle bacillus. Am Rev Tuberc 54: 62-66.

Sula, L. and Radkovsky, I. 1976. Protective effects of *Mycobacterium microti* vaccine against tuberculosis. J.Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 20:1-6.

Supply, P., Mazars, E., Lesjeans, S., Vincent, V., Gicquel, B. and Locht, C. 2000. Variable human minisatellite-like region regions in *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol. Microbiol. 36:762-771.

Tekaia, F., Gordon, S., Garnier, T., Brosch, R., Barrell, B. and Cole, S.T. 1999. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuber Lung Dis 79:329-342.

Thierry D, Cave MD, Eisenach, KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL.1990. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium* complex. Nucleic Acids Res 18: 188.

Thoen, C.O., Mills, K. y Hopkins, M.P. 1980. Enzyme-linked protein A: an enzyme-linked immunosorbent assay reagent for detecting antibodies in tuberculosis exotic animals. Am. J. Vet. Res. 41(5): 833-835

Thompson PJ, Cousins DV, Gow BL, Collins DM, Williamson BH, Dagnia HT. 1993. Seals, seal trainers, and mycobacterial infection. Am Rev Respir Dis. Jan;147(1):164-7.

Torres, P., Abdala A. A., Tarabla H.D., y Bertero S. Vigilancia epidemiológica de la tuberculosis bovina en el departamento de Castellanos, Santa Fe. Taller internacional sobre infecciones humanas y animales producidas por clamidias, micobacterias, brucelas y borrelias". Buenos aires 25 de junio al 4 de julio de 1997, Facultad de Ciencias Veterinarias UBA.

Trias J, Jarlier V, Benz R. 1992 Porins in the cell wall of mycobacteria. Science. Nov 27;258(5087):1479-81.

van der Zanden, A. G. M., K. Kremer, L. M. Schouls, K. Caimi, A. Cataldi, A. Hulleman, N. J. D. Nagelkerke, and D. van Soolingen. 2002. Improvement of Differentiation and

Interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by Introduction of New Spacer Oligonucleotides. JCM. Dec. Vol. 40, No. 12: 4628–4639

van Embden JD, van Soolingen D, Small PM, Hermans PW. 1992. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. Res Microbiol. May;143(4):385-91.

van Embden, J. D., T. van Gorkom, K. Kremer, R. Jansen, B. A. Der Zeijst, and L. M. Schouls. 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. J. Bacteriol. 182:2393–2401.

van Pinxteren, LA, Ravn, P, Agger, EM, Pollock, J, Andersen, P. 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. Clin Diagn Lab Immunol. Mar. 7 (2): 155-60.

van Soolingen, D. and Kristin Kremer. 2003. Characterization of the Manila Family of *Mycobacterium tuberculosis* JCM. June Vol. 41, No. 6: 2723–2726

van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JD. 1997 A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol. Oct;47(4):1236-45.

van Soolingen, D., Haas, P., Haagsma, J., Eger, T., Hermans, P., Rittaco, V., Alito, A. and van Embden, J.1994.Use of various genetic markers in differentation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. JCM. 32:2425-2433.

van Soolingen, D., Hermans, P., de Haas, P., Soll, D. and van Embden, J. 1993. Occurrence and stability of insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. JCM 29: 2578-2586.

van Soolingen, D. And Hermans, P. 1995. Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. Eur Respir J. Vol 8. 649-656.

van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P., Douglas, J., Enkhasaikan, D. and van Embden, J. 1995. Predominance of a single clone of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. JCM 33:3234-3238.

van Soolingen, D., van der Zanden, A., de Haas, P., Noordehoek, G., Kiers, A., Foudraine, N., Portaels, F., Kolk, A., Kremer, K. and van Embden, J. 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* Infections among Humans by Using Novel Genetic Markers. JCM. July 1, Vol. 36, No. 7, 1840–1845

Vordermeier, M., Whelan, A. O. and Hewinson, R. G. 2003. Recognition of mycobacterial epitopes by T cells across mammalian species and use of a program that predicts human HLA-DR binding peptides to predict bovine epitopes. Infect Immun 71,1980-1987.

Wayne LG. 1976. Dynamics of submerged growth of *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and microaerophilic conditions. Am Rev Respir Dis. Oct;114(4):807-11.

Weyer, K., Fourie,P., Durrheim, D., Lancaster, J., Haslov, K and Bryden, H. 1999. Int. J. Tuberc and Lung Dis 3:1113-1119.

Wheeler, P and Ratledge, C. 1994. Metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. In Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, pp.353-385. Edited by B. Bloom Washington, DC. ASM.

Wilson, T., Wards, B.J., White, S.J., Skou, B., de Lisle,G.W., Collins, D.M. 1997. Production of avirulent *Mycobacterium bovis* strains by illegitimal recombination with DNA fragments containing an interrupted *ahp*C gene. Tubercle Lung Disease 78:229-235.

Wilson, T.M., De Leslie, G.W. y Collins, D.M. 1995. Effect on inhA and katG on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 15::1009-1015.

Woof, E., Michell, S., Gordon, S., Chambers, M., Bardarov, S., Jacobs Jr., W., Hewinson, G. and Wheeler, P. 2002. Functional genomics reveals the sole sulphate transporter of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its relevance to the adquisition of *sulphur in vivo*. Mol. Microbiology 43 (3), 653-663.

Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. 1999. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. J Bacteriol. Apr;181(7):2044-9.

Zhang Y, Wallace RJ Jr, Steingrube VA, Brown BA, Nash R, Silcox A, Tsukamura M. 1992. Isoelectric focusing patterns of beta-lactamases in the rapidly growing mycobacteria. Tuber Lung Dis. Dec;73(6):337-44.

Zinsser, Joklik, Willett, Amos. Zinsser 1998. Microbiología. 18°edición. Ed. Panamericana.

Zumárraga MJ, Bernardelli A, Bastida R, Quse V, Loureiro J, Cataldi A, Bigi F, Alito A, Castro Ramos M, Samper S, Otal I, Martin C, Romano MI. 1999a. Molecular characterization of mycobacteria isolated from seals. Microbiology. Sep;145 (Pt 9):2519-26.

Zumarraga MJ, Resoagli EH, Cicuta ME, Martinez AR, Oritiz de Rott MI, de Millan SG, Caimi K, Gioffre A, Alito A, Bigi F, Cataldi AA, Romano MI. 2001. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (PRA) of *Mycobacterium leprae* from human lepromas and from a natural case of an armadillo of Corrientes, Argentina. Int J Lepr and other mycobac. diseases. Mar, 69(1):21-5.

Zumárraga, M., Bigi,F., Alito,A., Romano, M:I., Cataldi, A. 1999c. A 12.7kb. fragment of the *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. Microbiology 145:893-897.

Zumárraga, M., Martín, C., Samper, S., Cataldi, A., Alito, A., Latini, O., Bigi, F., Roxo, E., Castro Ramos, M., Errico, F., van Soolingen, D. And Romano, M.I. 1999b. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infection in South America. JCM. 37:296-303.

11. AGRADECIMIENTOS.

Finalmente quiero agradecer a las instituciones y a todas las personas sin las cuales este trabajo no hubiese sido posible.

A la Universidad de Buenos Aires, el CONICET, la Fundación Antorchas, que permitieron mi formación y el desarrollo de mi carrera en mi país.

Al INTA, que me abrió sus puertas y al que hoy siento como mi lugar.

Al director del Instituto de Biotecnología, Dr. Rossetti por que permitió mi trabajo en completa libertad.

A los doctores Stephen Gordon, José A. Gutiérrez-Pabello, Adri van der Zanden, Clara Espitia, Nora Morcillo, y a Antonio Vallecillo, por que de una u otra manera colaboraron conmigo en el desarrollo de este trabajo.

A mi querido director: Angel, por confiar en mí, por alentarme para que yo confie en mí en esos momentos en que no teníamos respuestas, por abrirme las puertas de este maravilloso grupo de trabajo, por estar, por enseñarme la tuberculosis. Gracias Angel!!

A Marisa, por tu apoyo, por tu confianza en mí, por alentarme a la hora de iniciar nuevos proyectos, por la corrección de la tesis, por aceptarme como tu becaria postdoc.

A Fabi, gracias por todo, por tu aliento, por ayudarme a decidir en esos momentos difíciles, por tu complicidad, por tu calidad como profesional y compañera, siempre tendré tus "Ay! Nena" conmigo.

A mis compañeros, amigos y confesores, Andre y Martín, por tantas horas compartidas, por apoyarme y apoyarnos mutuamente, por darnos aliento, porque un gracias aquí no alcanzaría...

A Ali, por enseñarme tantas cosas, por ser nuestra "maestra", por tus locuras, por tu coherencia, por decirnos que hay y no hay que hacer, gracias!!

A los demás TBCianos, por compartir este grupo de trabajo, por aprender de Uds. Gracias. Paz, Virginia, Lauri, Vale, y bienvenido Nacho!!

A Marisa y Rose, por los cuestionamientos de Marisa, "si me quedo, si me voy"; y por el por qué de las cosas de Rosalía, y el entusiasmo que nos transmitís día a día.

Silvi, un gracias especial, por que sin vos no hubiera llegado hasta acá (literalmente), en serio gracias por abrirme las puertas de tu familia. Gracias Marcelo, Iri, Mori por cada mañana inolvidable.

A los vecinos, gracias a todos, por escuchar mis preguntas, por atender a mis pedidos. Gracias Eleo por las charlas y tu apoyo, Silvio, Ali, Juli, Mariela, Haydeé (me encanta pelear con vos) y a Lore y Lauri por que siguen estando...

A Oscar un gracias grande, por tu apoyo cuando no quise más, por tu ejemplo de excelencia profesional, por tener el tiempo y preocuparte por todos y cada uno en el Instituto.

A Andre, Ana, Caro por compartir tantas cosas, las tesis, la facu, la docencia, las charlas, Gracias chicas!!

A todo el lab de Virus animales, de un lado y de otro, Gracias a cada uno, Gabys, Dani, Analía, Lela, Silvi, Ari, Flor, Eva, Guido, Flavia (y llegamos Zanetti...).

A todos los plantólogos, por preocuparse por mi trabajo y esta tesis, por apoyarme, por preguntar, a todos y cada uno gracias...

A nuestra "cocina" Gracias!! Fabián, Vilma, María, Berta, Isa (Que haría yo sin vos!!!) y por que nuestro trabajo es gracias a Uds.

A nuestras secretarias, por asistirme cada vez que lo necesité y a Eva por comunicarme con el mundo exterior y por haberme acompañado todos estos años.

A los "babesiósicos" Mariana por tantos años de amistad y cosas compartidas, y a Gaaazzz por ser ese tipo maravilloso...

A Jorge y Nilda, por estar para mí y mis viejos, por enseñarme a seguir a pesar de todo...

A mis compañeras y amigas Vale, San, Vane, Caro, Vero, por la facu, tanto tiempo compartido, por el apoyo en la escritura de la tesis.

A mis amigos y hermanos en al vida, Clau, Fabi, Ceci, Leo, Clau, Pablo, Ale que me apoyan día a día en mi carrera, que entendieron y entenderán mis ausencias, por enseñarme a creer que yo también puedo, por traer al mundo a esos seres chiquitos y maravillosos y a quienes les debo tanto, Gracias!!!

A Anita, Vicente, Sari, Susana, Marcel, Javier por ser una más de la familia desde el principio, por acompañarme en mis proyectos, por el todos los días...

A mi cuñado-hermano, Enrique, sin vos esto no estaría aquí, gracias por cada hora que te saqué, por tu infinita paciencia, por ser esa persona maravillosa...

A Katty y Jorge por guiarme día a día, por enseñarme el verdadero sentido de todo, por que la palabra gracias es muy pequeña...

A mi gran amor, Fer, por entender, por renunciar, por acompañar mis proyectos, por ser mi amigo y compañero y por que sos la razón de todo...te amo

A Dios...